КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пол С. Садек

Перевод с английского И. Дубинского

Sadek P.C.
Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual.
Wiley-Interscience, 1999, 320 pp.

Главным в моей жизни людям:
Тамми, Джефри, Бекки, Чарльзу и Джоанне

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эта книга предназначена и специально написана для химиков-аналитиков, не знакомых или не имеющих достаточного опыта работы с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), если угодно, это – лабораторное пособие. Она рассчитана на использование в лаборатории, рядом с приборами. Книга даже сшита спиралью, чтобы удобнее было разворачивать на столе. Содержание книги изложено в логической последовательности: порядок разделов воспроизводит порядок прохождения подвижной фазы по компонентам хроматографической системы – от флаконов с элюентами до детектора.

В начале (глава 1) дано подробное описание аппаратуры для ВЭЖХ и широкого спектра дополнительных приспособлений. Описаны назначение каждого компонента, его место в системе и работа. В главе 2 очень детально представлены общие параметры, используемые при определении рабочих характеристик ВЭЖХ-системы. Кроме того, в главе 2 конспективно рассмотрены различные варианты ВЭЖХ (например, обращённо-фазная, хиральная, эксклюзионная). Эти главы являются вводными по отношению к главе 3.

В главе 3 показано, с какими нештатными ситуациями может встретиться хроматографист (например, с возникновением нестабильности потока или повышением давления) и чем именно они могут быть обусловлены. Далее объясняется, как выявить и устранить неисправность. Заключительная часть главы 3 посвящена планированию профилактических регламентных работ. Именно они дают возможность предупредить нештатные ситуации. Каждый хроматограф должен быть снабжён планом профилактических регламентных работ, который надлежит неукоснительно выполнять.

В книге нет ни детального изложения основ теории, ни пространных рассуждений о вариантах применения, ни многословных прений о разработке и оптимизации методик. Эти вопросы никак не связаны с обнаружением и устранением распространённых неполадок.

Надеемся, что книга избавит аналитиков от напрасных трат времени, помогая быстро выявить и устранить причины нештатных ситуаций, к сожалению, то и дело встречающихся в повседневной работе с хроматографом.

Пол С. Садек

Гранд-Рапидс, штат Мичиган

ВВЕДЕНИЕ

За последние 25 лет высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) стала одним из основных методов анализа, используемым в трёх из каждых четырёх аналитических лабораторий. Причин этому, по меньшей мере, шесть.

Во-первых, невероятно выросло количество детекторов, которые можно использовать в жидкостной хроматографии (ЖХ). Вначале применялись только ультрафиолетовый (УФ) детектор с фиксированной длиной волны и рефрактометр. Теперь же широко применяются диодно-матричный детектор (детектор с матрицей фотодиодов), испарительный нефелометрический, сканирующий флуориметрический, электрохимический, кондуктометрический и масс-спектрометрический детекторы. Требования снижения предела обнаружения и повышения чувствительности вызвали к жизни непрестанное улучшение параметров этих детекторов. К тому же, улучшились надёжность работы и устойчивость этих детекторов к внешним воздействиям.

Одновременно проходила компьютеризация средств управления хроматографическими системами, они становились всё более удобными в пользовании. Росли возможности сбора и обработки данных. Главной движущей силой повсеместного применения этих средств стал прогресс вычислительной техники. При совсем небольших затратах можно накапливать огромные количества данных, анализировать результаты каждого опыта, быстро получать статистические и сравнительные совокупности данных, печатать подробный отчёт или сжатую сводку результатов.

Во-вторых, были значительно усовершенствованы насосные системы – в отношении диапазона скоростей потока, воспроизводимости и надёжности. Насосы развивают более высокое давление, что позволяет использовать элюенты в более широком диапазоне вязкостей. Применение градиентных систем, позволяющих задавать многоступенчатый и нелинейный профили и использовать смеси от двух до шести, и даже более, составляющих стало нормой. Воспроизводимость работы насосов обеспечивает подачу подвижной фазы в диапазоне скоростей от 1 мкл/мин до 5 мл/мин с точностью не хуже ± 1 %.

В-третьих, устройства автоматической подготовки и ввода пробы (автосамплеры) и автоматические инжекторы обеспечивают разбавление с высокой точностью проб непосредственно перед вводом, нагревание и охлаждение

проб, допускают промывку или очистку иглы между введением проб. Объёмы проб могут изменяться от долей микролитра до миллилитров с точностью не хуже ± 0,2 %. Нередки устройства для пробоподготовки, рассчитанные на одновременную обработку до 100 проб, при этом их программирование не представляет сложностей.

Помогает и то, что программы управления хроматографическими системами отличает изобилие функций, в частности, ведение журнала технического обслуживания, оценка пригодности системы для выполнения анализов, обеспечение выполнения надлежащей практики проведения работ в лаборатории (GLP). Все действия, выполняемые на хроматографе, и полученные в процессе работы результаты заносятся в архив. Во многих программах имеется функция предупреждения оператора по истечении определённого времени эксплуатации о необходимости замены отдельных элементов или планового профилактического обслуживания.

В-четвёртых, постоянно возрастают количество, качество и доступность растворителей высокой чистоты для ВЭЖХ. Это крайне важно, поскольку современные детекторы предполагают использование растворителей, не дающих ни одного хроматографического пика в холостом опыте в градиентом режиме даже на самой высокой чувствительности детектора. Снижение пределов обнаружения, отличающее современные детекторы, требует, чтобы качество растворителя не менялось от партии к партии, поскольку в противном случае не удастся обеспечить постоянство нулевой линии и отклика анализируемых веществ. В свою очередь, наличие более широкого спектра растворителей высокой чистоты с постоянными характеристиками способствует снижению пределов обнаружения, повышению чувствительности, улучшению воспроизводимости; более широкий выбор элюентов позволяет также улучшить селективность разделения.

В-пятых, количество типов и размеров колонок с высокими хроматографическими характеристиками практически бесконечно. По сути, разработки здесь достигли такой степени специализации, при которой зачастую колонки создаются для разделения одного набора анализируемых веществ. Если, в своё время, колонки обычно обозначались просто «C_{18} (октадецилсиликагель)», «C_8 (октилсиликагель)», «цианопропил» и т. д., то сейчас, например, одного только октадецилсиликагеля, т.е. C_{18}, уже есть, по меньшей мере, семь принципиально разных видов фаз: с полимерной плёнкой, с мономерной плёнкой, с мономерной плёнкой с традиционным или нового типа блокированием остаточных групп (энд-кэппингом), с высоким и низким содержанием углерода, с дезактивированным носителем, а также на основе силикагеля сверхвысокой чистоты. Если при этом учесть, что средний диаметр зерна фаз может находиться в диапазоне 1,5 до 10 мкм, а его форма может быть как сферической, так и

неправильной, при этом диаметр пор может варьировать от 30 до 3000 ангстрем, материал может быть объёмно-пористым, поверхностно-пористым либо непористым, то число возможных вариантов характеристик заполнения колонок возрастёт экспоненциально.

Химическая обработка поверхности силикагеля позволяет получить как колонки общего применения (C_{18}, C_8, цианопропил и пр.), предназначенные для разделения широкого спектра веществ, так и носители специального назначения (циклодекстрин, хиральный типа Пиркле, с пропиткой нитратом серебра и пр.), рассчитанные на разделение определённого типа соединений. Последнее слово в специализации – фазы с отпечатками молекул, предназначенные каждая для анализа одного конкретного вещества. Наконец, если ранее в качестве носителей использовали только силикагель и окись алюминия, сейчас применяют довольно необычные вещества, как то, окись циркония, графитированный углерод, гидроксилапатит, а также множество органических полимеров и сополимеров.

В-шестых, и это, возможно, самое важное, ЖХ уже представляет собой хорошо оформленный метод, что проявляется в наличии многих тысяч готовых хорошо документированных методик. Заложенная в них информация даёт хроматографисту хороший исходный набор параметров для разработки новых методик, а во многих случаях и позволяет сразу же воспроизвести условия, при которых достигаются наилучшее разделение и количественное определение анализируемых веществ. Организации, распространяющие валидированные методики, (например, Фармакопейный комитет США (USP) [1] или Общество по испытаниям и материалам США (ASTM) [2]), а также организации [3], отвечающие за согласование межлабораторных программ валидации, например, Организация официальных химиков-аналитиков США (AOAC) [4], сыграли решающую роль в расширении возможностей самого метода ВЭЖХ и его применимости для широкого круга задач анализа. Процесс получения таких методик значительно ускорился с появлением средств оперативного компьютерного поиска и расширения публикации соответствующих журналов в электронной форме.

Изменение потребностей химической промышленности способствовало тому, что метод ВЭЖХ стал применяться в анализе гораздо большего круга веществ, даже тех которые ранее анализировали с помощью газовой хроматографии (ГХ). Критическим моментом, который определил эту тенденцию стал вопрос совместимости анализируемых веществ в пробе и особенностей самого метода анализа. Повышенные температуры, которые необходимы в инжекторе газового хроматографа, чтобы испарить анализируемые вещества с большой молекулярной массой, могут привести к разложению этих веществ или изменению их структуры. Хотя в некоторых случаях удаётся преодолеть этот недоста-

ток за счёт получения производных, каждая дополнительная стадия анализа влечёт за собой его удорожание и снижение производительности лаборатории. Разумеется, ВЭЖХ присущи свои ограничения, налагаемые, в частности, растворимостью пробы в растворителе и совместимостью пробы с растворителем, однако в целом эти ограничения куда меньше сдерживают применение метода, чем в случае ГХ. Зачастую пробу можно растворить и ввести в хроматограф непосредственно, избегая, таким образом, длительного процесса экстрагирования и концентрирования, либо получения производных. Для других случаев разработано множество растворителей и методик пробоподготовки.

ВЭЖХ, по всей видимости, будет всё шире использоваться в аналитических лабораториях в ближайшие десять лет. Этот метод можно считать вполне оформленным, иначе говоря, то, что беспокоило аналитиков раньше, забыто, теперь они сосредоточивают внимание на более сложных случаях разделения. При этом под «более сложными» следует понимать случаи, в которых не только большее количество пиков подлежат количественной обработке, но этому сопутствуют требования снижения предела обнаружения, приборных шумов, повышения чувствительности, улучшения селективности методики или её специфичности.

Эта книга, по идее, должна выступить как набор готовых рецептов для тех, кто вовсе не знаком с ВЭЖХ или обладает ограниченной подготовкой по этому методу. Для них здесь найдутся основополагающие сведения об эксплуатации и техническом обслуживании аппаратуры для ВЭЖХ и о том, как лучше всего избегать ошибок и устранять нештатные ситуации. Заметим, что для этого нужно знать, из чего состоит хроматографическая система, владеть терминологией хроматографии и быть осведомленными в её основных принципах. Подробности разработки методик, оптимизации разделения, фундаментальная теория хроматографии остались за рамками этой книги. Если они здесь и упоминаются, то вскользь. Зато в конце введения дан перечень превосходной литературы по теории разных вариантов разделения, разработке и оптимизации методик.

Чтобы хроматографисту было легче с помощью книги достичь того, ради чего она написана, то есть избежать ошибок в работе, книга разделена на три части и снабжена терминологическим указателем и приложением. В первых двух главах излагается строение аппаратуры для ВЭЖХ, вводится основная терминология по хроматографии, даются определения параметров и переменных, рассматриваются важные аспекты валидации методик и приборов.

Глава 1 посвящена аппаратуре для ВЭЖХ и является ознакомительной. Подробно описаны компоненты, широко используемые в ЖХ, дан обзор их

основных функций и важнейших характеристик. Описаны также взаимодействие компонентов установки друг с другом и порядок их соединения.

Глава 2 посвящена принципам, лежащим в основе разделения, в ней даны определения важнейших переменных и параметров. В этой главе читатель знакомится с терминами, часто встречающимися в литературе по ВЭЖХ и описаниях методик. В частности, вводятся понятия валидации работы аппаратуры для ВЭЖХ, валидации методики в общем виде и текущего контроля применимости конкретной аппаратуры.

Валидация самого хроматографа означает подтверждение того, что все его блоки функционируют в допустимых и предписанных пределах. Зачастую эти пределы определяются заданными изготовителем техническими характеристиками, например, диапазоном скоростей потоков, зависящим от рабочих параметров насоса, диапазоном объёмов пробы, зависящим от параметров инжектора, юстировкой, калибровкой по длине волны и яркостью лампы детектора. Кроме того, в главе 2 кратко описаны разные варианты классификации способов разделения в ЖХ.

Валидация аппаратуры для ВЭЖХ – процесс длительный и взыскательный. Его результатом является документальное свидетельство того, что прибор работает надлежащим образом. Такое свидетельство крайне важно для лабораторий, отвечающих за представление результатов в государственные органы, как то, Управление по пищевым продуктам и лекарственным препаратам США (FDA), Министерство сельского хозяйства США (USDA) и Управление по охране окружающей среды США (EPA). Полномасштабная валидация хроматографической аппаратуры сопряжена с большими временными и денежными затратами. Как правило, валидацию такого рода проводят не сотрудники лаборатории, а специальные уполномоченные фирмы.

Привлечение таких сторонних организаций к валидации на договорной основе обусловлено рядом соображений. Во-первых, их сотрудники специально обучены испытывать, обслуживать и ремонтировать приборы, на которые распространяются договоры. Во-вторых, зачастую эти же организации один-два раза в год осуществляют обслуживание в рамках плана профилактических регламентных работ. Во многих случаях договором также предусматривается, что в случае выхода оборудования из строя в течение одних-двух суток будут выполнены ремонт, а при необходимости, и повторная валидация. Ещё одно преимущество таких договоров состоит в том, что лаборатории не приходится держать на складе запасные части, которые стоят дорого, а понадобиться могут редко. Наконец, сотрудники лаборатории могут не учиться специально ремонту оборудования, а сосредоточиться на получении и истолковании результатов.

Привлечение на договорной основе сторонних организаций целесообразно также, когда речь заходит о аудите (ревизии деятельности) действующей лаборатории, поскольку это – своего рода поручительство за надёжность ее работы. Уполномоченные организации оформляют все документы, связанные с подтверждением во время ревизии правильности работы оборудования. По сути, эти документы, удостоверяющие, что фактические показатели лабораторной системы соответствуют её эксплуатационным характеристикам, являются важнейшим подтверждением достоверности всех результатов, полученных с помощью этого прибора.

К сожалению, испытания и валидация жидкостного хроматографа на предмет соответствия заданным характеристикам – только первый из множества этапов, которые нужно выполнить, чтобы получать статистически достоверные и документированные результаты. После валидации прибора надлежит ещё разработать порядок выполнения анализов и провести его валидацию.

Как уже было сказано, подробное рассмотрение разработки методик выходит далеко за рамки этой книги. Достаточно отметить, что разработка методики – это общий процесс, однако каждый набор конечных результатов относится *к одному конкретному разделению и анализу*. Разработка методики представляет собой процесс, в котором заранее заданный набор анализируемых веществ разделяется и отделяется от побочных веществ матрицы. Затем осуществляют количественное определение анализируемых веществ. В процессе разработки методики определяют рабочие параметры, при которых осуществлены разделение и количественное определение. К ним относятся, например, колонка, состав подвижной фазы, скорость потока, порядок пробоподготовки и объём пробы, уровни квалификации стандартов, температура, вид детектора (и его установки), программа сбора данных и соответствующие параметры.

После того, как методика разработана и найдена приемлемой, она подлежит валидации (необходимым условием валидации методики является то, что система для ВЭЖХ работает в допустимых пределах, причём рабочие параметры для данного разделения соответствуют требуемым, то есть функционирование хроматографа также прошло валидацию). При валидации методики определяют её правильность и точность, рабочие пределы, воспроизводимость, пределы обнаружения, устойчивость к изменению внешних условий и параметры прибора, определяющие его пригодность для выполнения данной методики.

Оценка пригодности системы предполагает постоянный текущий контроль рабочих параметров, показывающих, как работает данная конкретная аппаратура для ВЭЖХ. Накопление данных с использованием валидированной

методики помогает гарантировать правильность получаемых результатов. А то, что в конкретном опыте все параметры системы находятся в пределах пригодности, в свою очередь, помогает гарантировать правильность и точность результатов, полученных для данного набора проб.

Из этого следует, что химику-аналитику важно знать сроки проведения, параметры и переменные, связанные с валидацией (оценкой пригодности) системы, поскольку любые отклонения в них могут указывать на возникновение нештатной ситуации или ошибки. Связь между этими параметрами и возможными ошибками рассматривается в главе 2.

Хотя валидация и постоянный текущий контроль аппаратуры в процессе анализа посредством оценки соответствия рабочих параметров пределам пригодности и дают возможность получать статистически достоверные результаты анализов, с течением времени неизбежно возникают отклонения в работе аппаратуры для ВЭЖХ от нормального режима. Действительно, одни детали и узлы (плунжеры, поршневые кольца) изнашиваются, другие (фильтры на входе и выходе, фритты, обратные клапаны) загрязняются, а некоторые (источник излучения детектора, колонка) – вырабатывают ресурс. Если отклонение по любой причине возникает в ходе анализа, его результаты могут оказаться полностью или частично недостоверными. Это влечёт за собой простой аппаратуры, необходимость повторного отбора и анализа проб, а зачастую – срыв сроков ввода в эксплуатацию производства или выпуска продукции.

Чтобы избежать этого, следует принимать предупредительные меры. Например, предположим, что срок службы уплотнений плунжеров – девять месяцев. Тогда их замена в порядке профилактики каждые шесть месяцев позволит практически исключить аварийный отказ. Действия такого рода получили название *регламентных профилактических работ* (понятие регламентных профилактических работ и соображения по поводу разработки их графика приведены в главе 3).

Чтобы как следует воспользоваться материалом главы 3, необходимо предварительно тщательно изучить главы 1 и 2. Дело в том, что в ряде случаев в главе 3 даются рекомендации по устранению нештатных ситуаций, проявляющихся в отклонении хроматографических параметров от допустимых, как это описано в главе 2. Соответственно, в главе 3 сложности, с которыми может встретиться в работе хроматографист, описаны не совсем обычным способом: основное внимание уделяется компонентам аппаратуры и типичным ошибкам, обусловленным неудовлетворительной работой, выходом из строя либо ненадлежащим использованием этих элементов. Для этого рассматриваются все компоненты аппаратуры для ВЭЖХ и роль каждого из них в функционировании её в целом. Затем указываются распространённые причины возник-

новения неисправностей и подробно излагаются подходы к их вычленению и устранению (протоколы устранения неисправностей).

В терминологическом указателе даны термины ВЭЖХ, в том числе, составные термины и сокращения, и их определения. Назначение указателя – послужить справочным пособием для тех, кто никогда раньше не работал с ВЭЖХ или работал достаточно давно (с возвращением!). В приложении приведены таблицы, графики и диаграммы, иллюстрирующие часто встречающиеся физические и химические параметры хроматографических систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакопейный комитет США (USP). Рокфорд, штат Мэриленд.
2. Общество по испытаниям и материалам США (ASTM). Уэст-Коншохокен, штат Филадельфия.
3. Ассоциация по косметике, гигиеническим принадлежностям и ароматическим веществам. Вашингтон, округ Колумбия.
4. Организация официальных химиков-аналитиков США. Гейтерсберг, штат Мэриленд.
5. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development,* 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1997 (Снайдер Д., Керкланд Дж., Глайх Й. Разработка методик ВЭЖХ для практиков).
6. P.R. Brown and R.A. Hartwick (eds.), *High Performance Liquid Chromatography,* John Wiley & Sons, New York, 1989 (Высокоэффективная жидкостная хроматография. Ред. П. Браун, Р. Хартвик).
7. L.R.Snyder and J.J.Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromnatography,* John Wiley & Sons, New York, 1979 (Снайдер Д., Керкланд Дж. Введение в современную жидкостную хроматографию).
8. B.A. Bidlingmeyer, *Practical HPLC Methodology and Applications,* 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1992 (Бидлингмейер Б. Методика и приложения ВЭЖХ для практиков).
9. V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography,* 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994 (Мейер В. Высокоэффективная жидкостная хроматография для практиков).
10. U.D. Neue, *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997 (Нойе У. Колонки для ВЭЖХ: теория, технология и практика).
11. R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography for the Analyst,* Marcel Dekker, New York, 1994 (Скотт Р. Жидкостная хроматография для аналитиков).

1

КОМПОНЕНТЫ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

На рис. 1.1 приведена для справок блок-схема аппаратуры для ВЭЖХ. Следует отметить, что в ней присутствуют дополнительные компоненты, которых нет, поскольку они не нужны, в большинстве обычных установок для ЖХ. Например, регуляторы давления, предколонки, блок постколоночной дериватизации (получения производных после разделения компонентов) имеют довольно ограниченное специализированное применение, однако источником ошибок они могут стать точно так же, как любой другой компонент хроматографической системы. Соответственно, они представлены для полноты картины и для понимания того, что может помочь устранить (или предотвратить) ошибки. Книга об ошибках в хроматографии была бы неполной и без рассмотрения пробоподготовки, хотя соответствующие устройства и не входят в прямом смысле слова в состав хроматографической аппаратуры.

1.1. Аппаратура для ВЭЖХ

Рассматривать компоненты аппаратуры для ВЭЖХ можно по-разному. Мы представим обзор блоков хроматографа в общем виде – от начала (т.е. блока подачи элюентов), затем через описание насоса, инжектора, колонки, детектора, и до конца (т.е. ёмкости для отработанных материалов).

Элюенты представляют собой чистые жидкости, смеси жидкостей или жидкости, в которых растворены модификаторы. Для обеспечения воспроизводимости при работе состав элюента должен быть описан полно и недвусмысленно, чтобы можно было приготавливать один и тот же элюент снова и снова. Приготовленные элюенты хранят в *резервуарах*, откуда они поступают в *насосы* за счёт действия плунжера и обратного клапана. Элюент поступает из резервуара, проходит через *входной фильтр* и *соединительный трубопровод*, как показано на рис. 1.2. Скорость, с которой жидкость прокачивается через фильтр и трубопровод, определяется вытеснительным объёмом и частотой циклов хода плунжера. Поскольку объём, вытесненный за один ход плунжера, для данного насоса есть величина постоянная, расход элюента регулируют, меняя частоту циклов хода плунжера.

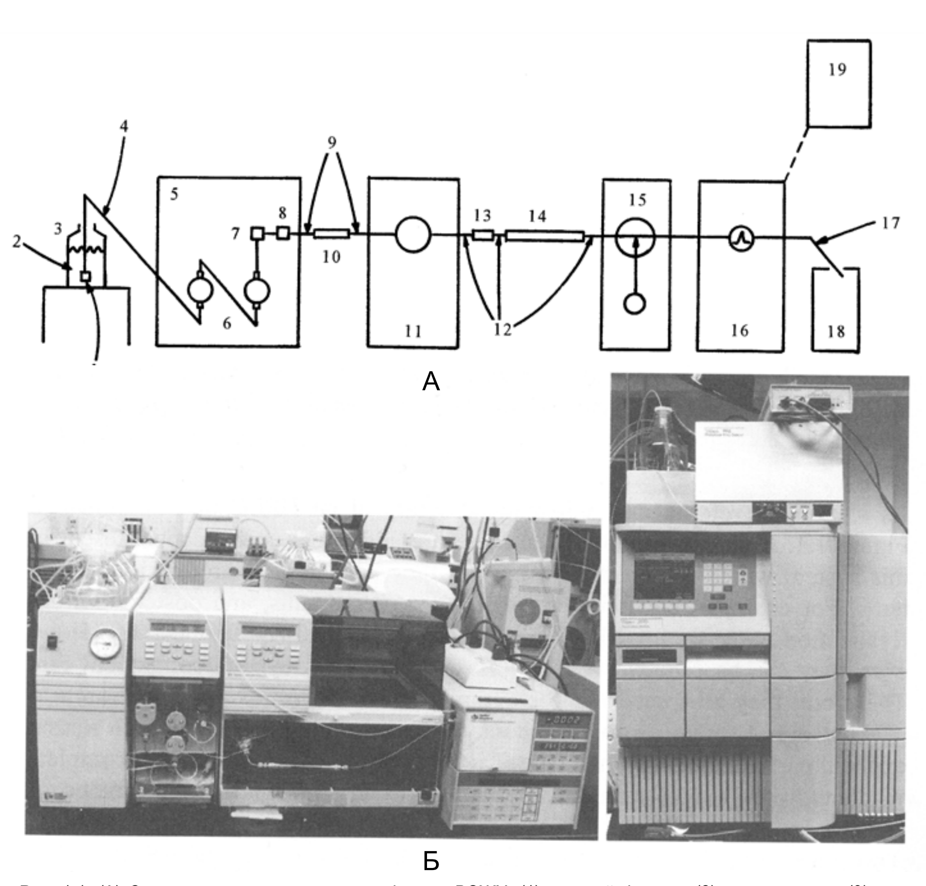


Рис. 1.1. (А) Структурная схема хроматографа для ВЭЖХ: (1) входной фильтр; (2) растворитель; (3) резервуар; (4) трубопровод низкого давления с большим внутренним диаметром; (5) насос; (6) корпус насоса в сборе; (7) датчик давления; (8) регулятор давления или фильтр в канале трубопровода; (9) трубопровод высокого давления с большим внутренним диаметром; (10) насыщающая предколонка; (11) инжектор (может быть автоматический) или автоматическое устройство подготовки и ввода пробы; (12) трубопровод высокого давления с малым внутренним диаметром; (13) защитная предколонка; (14) аналитическая колонка; (15) послеколоночный реактор или блок пост-колоночной дериватизации; (16) детектор; (17) трубопровод низкого давления с большим внутренним диаметром; (18) резервуар для отработанного растворителя; (19) устройство сбора и обработки данных. (Б) Расположение компонентов аппаратуры для ВЭЖХ в лаборатории. Слева: традиционное расположение по горизонтали, каждый компонент занимает определённую площадь на рабочем столе. На фотографии слева направо: аппарат для дегазации, насос, инжектор и колонка, детектор (показана организация установки для изократического разделения, поскольку вытекающий поток рециркулируется в резервуар для растворителя). Справа: современное модульное исполнение, допускающее установку ряда компонентов аппаратуры друг на друга для экономии площади. Здесь: насос внизу, инжектор слева посредине, справа от него колонка, детектор и резервуар сверху. Также необходимо устройство сбора и обработки данных, которое занимает дополнительную площадь.

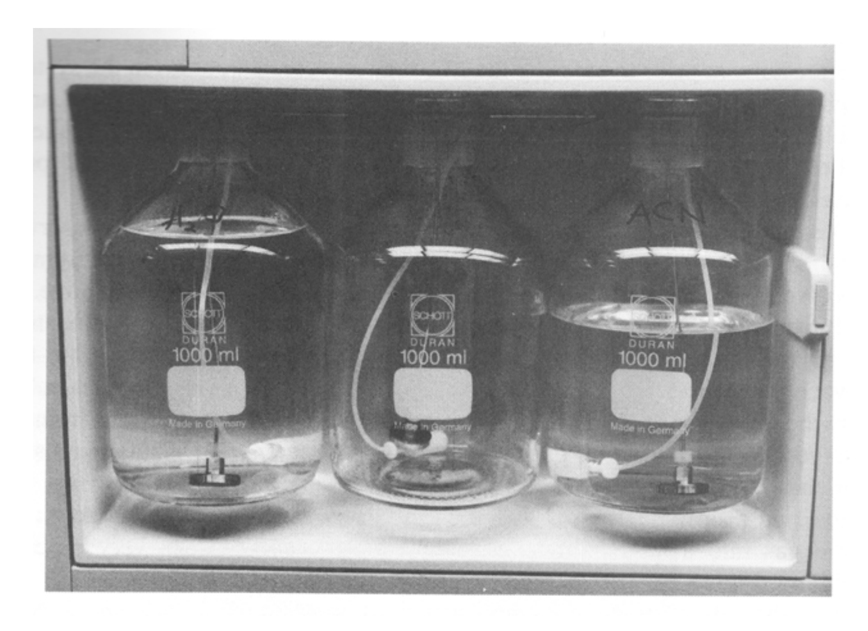


Рис. 1.2. Резервуары с трубкой для барботирования из спечённого стекла (белая) и входным фильтром и трубкой из нержавеющей стали (серые).

Входной фильтр зачастую изготавливают из нержавеющей стали, реже из фторопласта (политетрафторэтилен, иначе тефлон®) или спечённого стекла. Как правило, пористость входного фильтра довольно высока, так что он почти не препятствует прохождению элюента. Однако при слишком большом размере пор микрочастицы проникают сквозь фильтр в колонку. Входные фильтры подвержены накоплению остатка и могут постепенно засоряться некоторыми веществами, так что их необходимо время от времени чистить.

Соединительные трубопроводы зачастую изготавливают из фторопласта. Во многих случаях входной обратный клапан обработан под фторопластовую фланцевую муфту. Использование фторопластовых трубопроводов предоставляет ряд преимуществ. Во-первых, фторопласт не вступает в реакцию с наиболее распространёнными растворителями для ВЭЖХ. Далее, фторопласт гибок, дёшев, трубки из него выпускаются с самыми разными внутренними диаметрами и толщиной стенок, его легко резать и просто использовать. Наконец, фторопласт прозрачен, что позволяет оператору видеть, нет ли в трубопроводах пузырьков воздуха.

Как уже говорилось, перечисленные компоненты не должны препятствовать потоку элюента, поэтому используют входной фильтр с высокой пористостью и фторопластовые трубки большого внутреннего диаметра. Входной фильтр следует регулярно чистить или заменять на новый. Фторопластовые трубки также надлежит время от времени менять, но зачастую они могут прослужить больше года.

Хроматографисту, работающему с элюентами, нужно помнить, что растворённые в них газы могут вызвать нарушения в работе системы. Если не удалить газы из элюента до попадания в хроматограф, они могут выделяться в виде пузырьков, которые, накапливаясь в детекторе, вызывают усиленный дрейф нулевой линии. Более крупные пузырьки могут скапливаться в обратных клапанах, из-за чего может меняться произвольным образом расход и нарушаться градиентный режим. Чтобы этого избежать, элюент перед использованием *дегазируют*.

Дегазировать элюент можно четырьмя основными способами. Первый состоит в том, чтобы поместить резервуар с элюентом в ультразвуковую баню. Второй – в вакуумировании элюента (превосходный результат даёт сочетание вакуумирования и ультразвуковой обработки). Третий подход заключается в установке блока дегазации на пути тока элюента. Этот блок может быть малогабаритным, и тогда он крепится на резервуаре, либо отдельно стоящим, соединённым трубопроводами с резервуаром и корпусом насоса. В обоих случаях при поступлении жидкости из резервуара его пропускают через пористый фильтр с вакуумом, удаляя таким образом растворённые газы. Четвёртый вариант состоит в том, что фильтр из спечённого стекла или нержавеющей стали устанавливают внутри резервуара. Этот фильтр присоединён к источнику газа для барботирования, так что этот газ постоянно прогоняется через фильтр с незначительным расходом. Фильтр разбивает газ на множество мельчайших пузырьков, так что обеспечивается весьма эффективная дегазация. Примеры аппаратов для дегазации показаны на рис. 1.3.

После того, как элюент попал в насосную систему, его называют *подвижной фазой*. Заметим, что на практике в ВЭЖХ подвижная фаза – это и есть элюент (чистый растворитель или модифицированный), так что два эти термина взаимозаменяемы. Более корректно использовать термин «подвижная фаза» там, где речь идёт о фазах в колонке, поскольку там подвижная фаза прокачивается сквозь неподвижную фазу (иначе набивку).

А

Б

Рис. 1.3. Различные приборы для дегазации: (А) фильтр с вытяжкой; вакуумирование производится через боковой патрубок, входной и выходной фторопластовые трубопроводы размещены посредине; (Б) механическое устройство с вакуумированием до заданной степени разрежения (на передней панели имеется вакуумметр). Продолжение на следующей странице.

Состав подвижной фазы во времени может оставаться постоянным (*изократическое элюирование*) или изменяться (*градиентное элюирование*). От подвижной фазы зависит общее *среднее* время удерживания анализируемых веществ: при *более сильном элюенте* времени элюирования будет меньше, при *более слабом* – больше. Градиентные режимы элюирования могут быть самыми различными: линейный, экспоненциальный, ступенчатый и т.д. Некоторые, наиболее распространённые, из них показаны на рис. 1.4.

Столь различные графики градиентного режима используются для того, чтобы как можно лучше разделить (разрешить) пики анализируемых веществ и при этом как можно более сократить продолжительность анализа. Независимо от того, какой именно режим используется, зачастую забывают, хотя это очень важно, что состав подвижной фазы в конце режима отличается от того, что был в начале. Соответственно, прежде, чем вводить новую пробу, систему нужно вернуть в исходное состояние. Часто на то, чтобы полностью уравновесить систему в исходном состоянии, требуется довольно много времени. Для этого нужно, прежде всего, промыть *свободный объём трубопровода*, то есть объём между корпусом насоса и инжектором (называемый также «*мертвым» объёмом*), сам инжектор, все соединительные трубопроводы, детектор, объём пустого пространства, не заполненного сорбентом, в колонке *(«холостой объем»* колонки*)*. К тому же, уравновешивание элюента с колонкой не происходит мгновенно, для этого необходимо прокачать сквозь колонку от пяти до десяти её объёмов.

Как уже было сказано, подвижную фазу прокачивает через колонку насос. При этом образуется давление – за счёт *вязкости* самой подвижной фазы (вязкость – это свойство жидкости оказывать сопротивление перемещению) и сложной геометрии пути элюента в колонке (так называемая *трещиноватость слоя сорбента* в колонке). Чтобы обеспечить постоянство расхода и предотвратить протечку подвижной фазы между корпусом насоса и плунжером, используется *уплотнение плунжера* – уплотнительное кольцо, обычно на плотной посадке, зачастую подпружиненное. Плунжер и уплотнение должны прилегать друг к другу достаточно плотно, чтобы при давлениях до 40 МПа (6000 фс/дюйм^2) не возникало протечки. При этом уплотнение не должно вызывать затирания или выкрашивания поверхности плунжера, а плунжер – приводить к ускоренному истиранию поршневого кольца.

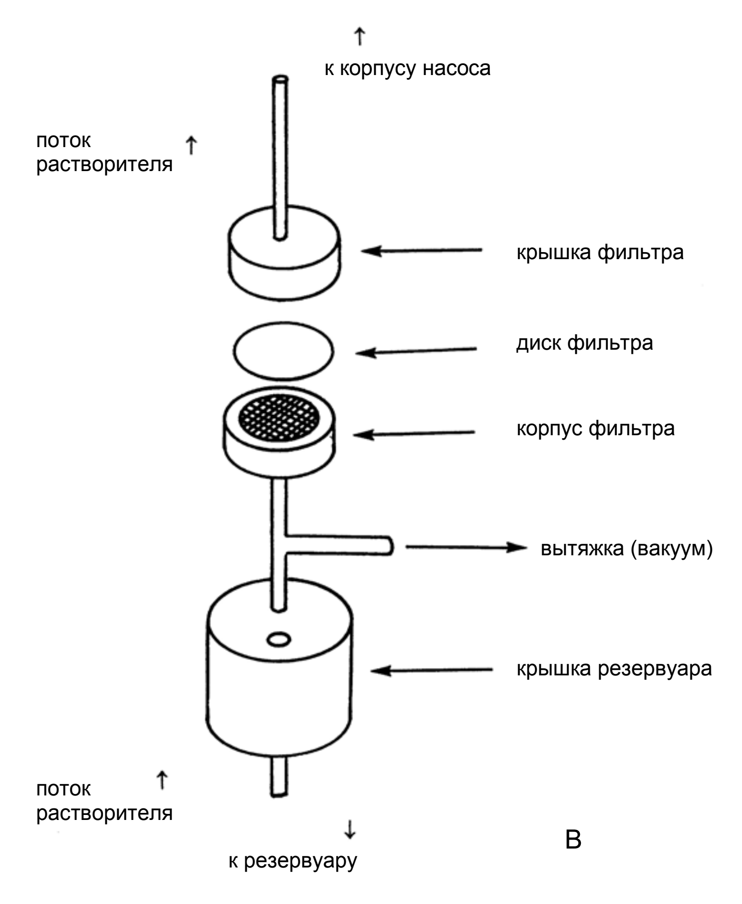


Рис. 1.3 (продолжение). (В) – детали прибора для дегазации на основе фильтра с вытяжкой.

Для изготовления плунжеров чаще всего используют сапфир. Параметры насоса зависят от диаметра, длины и шероховатости поверхности плунжера. Соответственно, механическую обработку плунжера выполняют с крайне малыми допусками. Зачастую его крепят в держателе из нержавеющей стали, который, в свою очередь, присоединяется к приводному механизму (например, эксцентриковому).

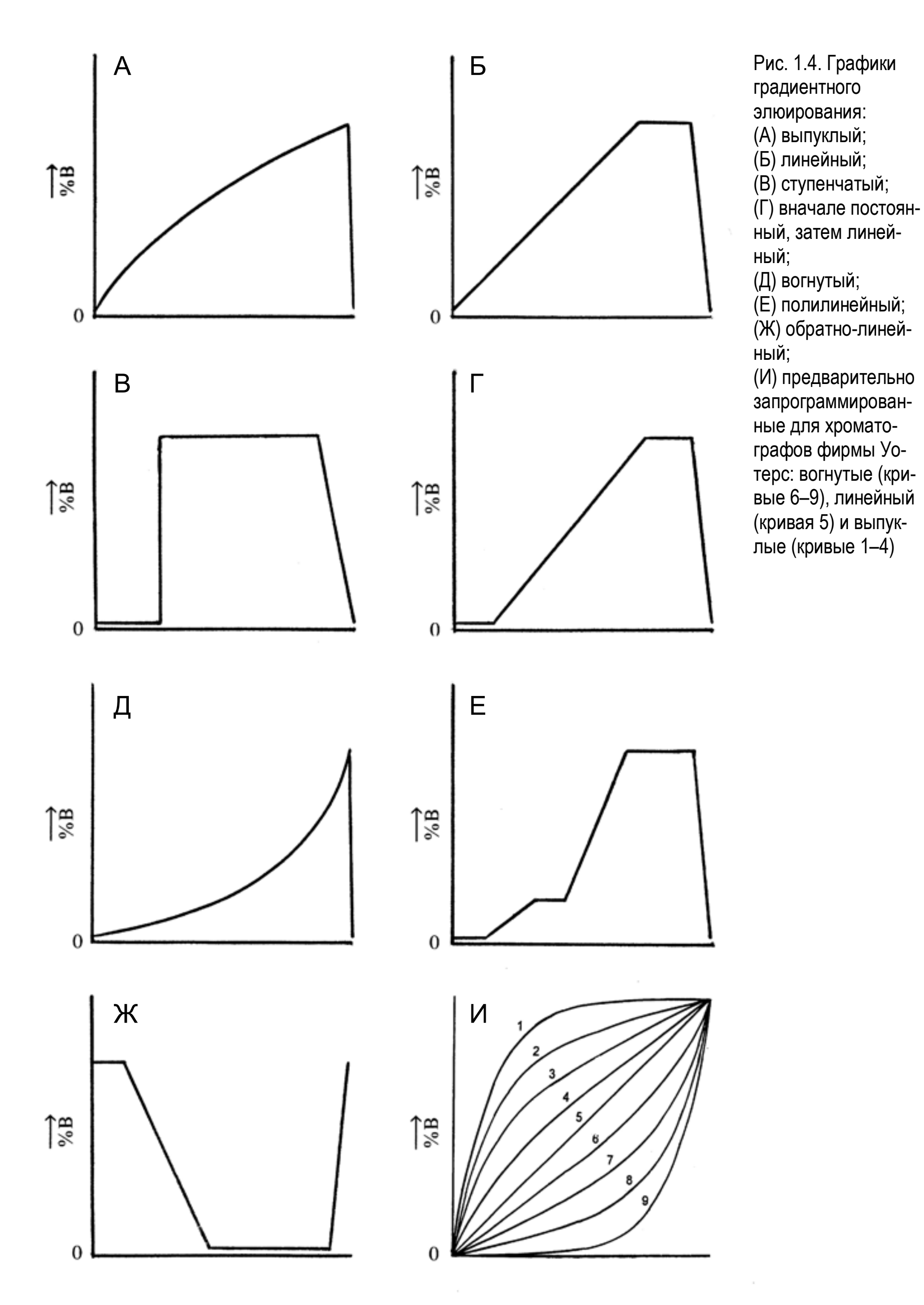
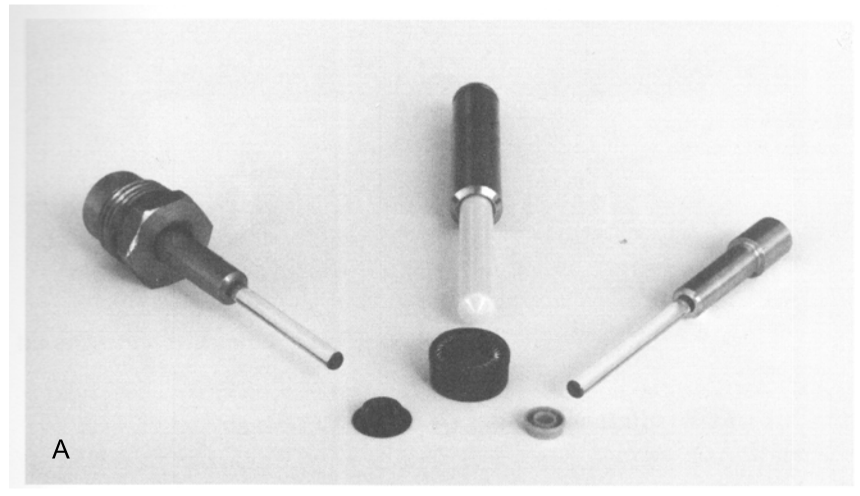


Рис. 1.4. Графики градиентного элюирования: (А) выпуклый; (Б) линейный; (В) ступенчатый; (Г) вначале постоянный, затем линейный; (Д) вогнутый; (Е) полилинейный; (Ж) обратно-линейный; (И) предварительно запрограммированные для хроматографов фирмы Уотерс: вогнутые (кривые 6–9), линейный (кривая 5) и выпуклые (кривые 1–4)

Уплотнение плунжера выполняют из мягкой пластмассы. Время от времени его нужно заменять, поскольку оно истирается под действием плунжера. Чтобы обеспечить требуемую плотность сочленения, не допустить протечки и ускоренного износа, следует использовать только те уплотнения плунжера, которые изготовлены специально для таких насосов. Напротив, плунжеры в замене не нуждаются, разве что при случайном задире, сколе или поломке. Их просто тщательно очищают при каждой замене уплотнения. На рис. 1.5 показаны варианты исполнения плунжерных узлов и соответствующие кольцевые уплотнения.

Насос включает один или несколько *узлов,* состоящих из *корпуса и плунжера*. Корпус насоса обычно выполнен из нержавеющей стали марки 316. В корпусе имеется небольшая полость. Перемещение плунжера в полость и из неё приводит, соответственно, к подаче в колонку и выкачиванию из резервуара очередной порции элюента. Полный цикл работы плунжера начинается с медленного управляемого выдвижения плунжера в полость до упора, при этом вся находившаяся в полости подвижная фаза подаётся в колонку. Затем следует быстрое выведение плунжера из полости (*обратный ход*), при котором новая порция элюента заполняет полость, после чего начинается следующий цикл. Диапазон скоростей подачи элюента насосом зависит от сочетания объёма полости, диаметра плунжера, длины хода плунжера и скорости его перемещения. Как правило, различают микронасосы (расход от 1 до 500 мкл/мин), аналитические (от 0,1 до 10 мл/мин) и препаративные насосы (расход свыше 5 мл/мин. Диапазоны расходов приведены примерные. Точные параметры насоса указывает в паспорте фирма-изготовитель).

Для изократического элюирования достаточно одного насосного узла корпуса с плунжером. Для градиентного режима требуются либо несколько насосных узлов, либо ряд соленоидов, управляющих расходом элюентов из нескольких резервуаров через один насосный узел. В любом из случаев градиентный режим предполагает смешение элюентов двух или более различных составов в изменяющейся пропорции. Смешивание может осуществляться либо до того, как элюент достигает плунжера (это называется *смешиванием под низким давлением*), либо после плунжера (*смешивание под высоким давлением*). Для смешивания под высоким давлением чрезвычайно важна дегазация, поскольку в результате подвижная фаза смешивается в малом объёме под большим давлением. Газовыделение при смешивании в этом случае вызовет серьёзные нарушения нормальной работы системы.



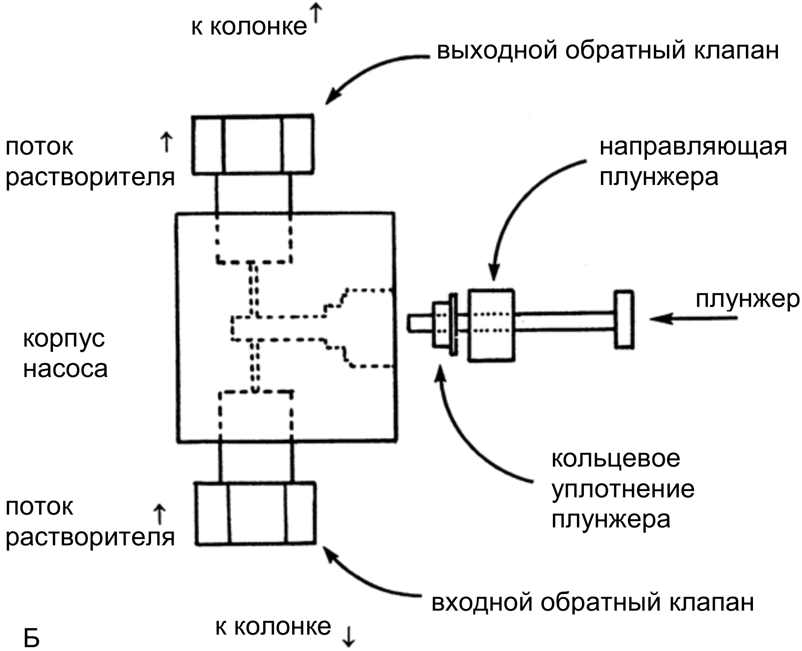


Рис. 1.5 (А) Плунжерные узлы трёх насосов. Слева и справа – узлы для аналитических опытов, посредине – для полупрепаративных. Следует обратить внимание на различия в диаметре плунжеров и форме поршневых колец. В каждом плунжерном узле внутри пластмассового корпуса имеется спиральная пружина, обеспечивающая герметизацию сочленения вокруг плунжера под высоким давлением. (Б) Устройство насоса.



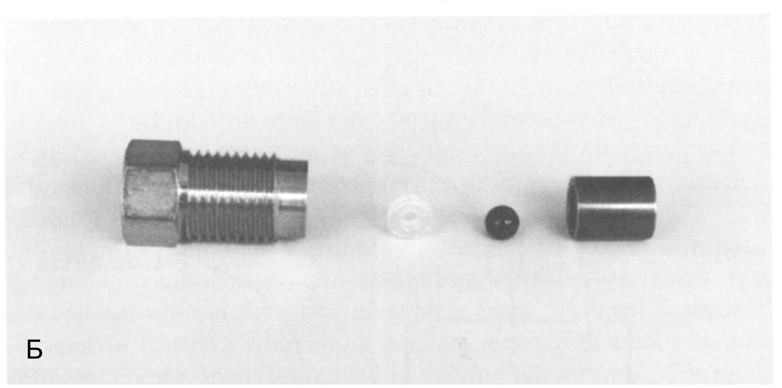


Рис. 1.6. (А) Три обратных клапана в сборе для трёх различных насосов. (Б) Обратный клапан в разобранном виде. Второе седло монтируется в правом полукорпусе (продолжение на следующей странице)

В насосных узлах, как правило, используются *обратные клапаны*, как показано на рис. 1.6. *Входной обратный клапан* препятствует противотоку подвижной фазы в резервуар для элюента. *Выходной обратный клапан* предотвращает всасывание подвижной фазы из колонки в насос. В момент, когда плунжер полностью введён (соответственно, подвижная фаза подана в колонку), поток в прямом направлении прекращается. Расход элюента остаётся почти нулевым во время возврата плунжера и всасывания новой порции элюента в полость насоса, пока плунжер не начнёт снова вводиться в корпус. На рис. 1.7 А показан график скорости потока в ряде циклов хода плунжера в одноплунжерном насосном узле.

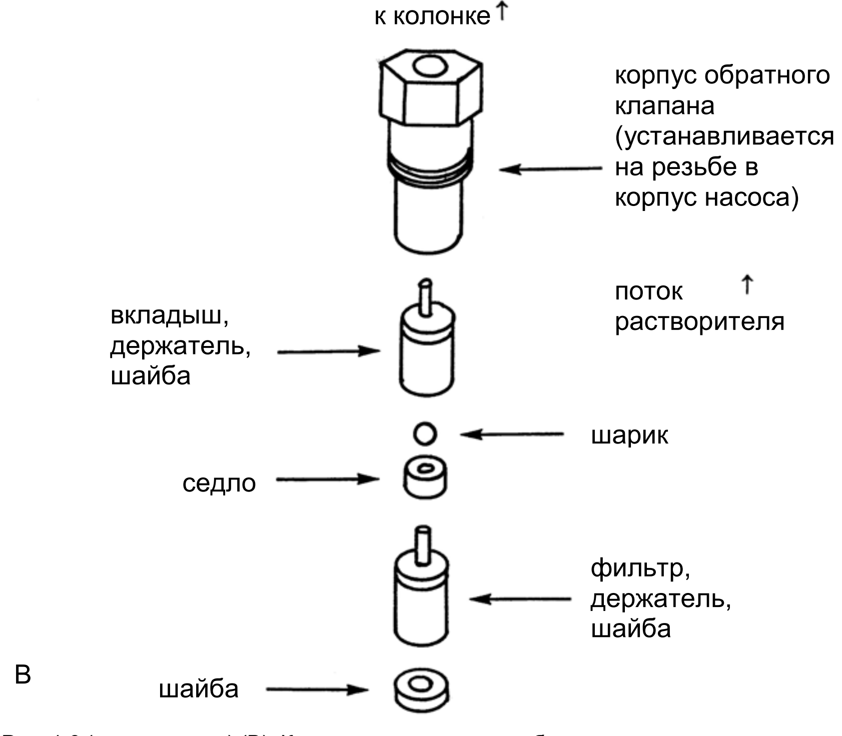


Рис. 1.6 (продолжение) (В). Конструкция выходного обратного клапана.

Чтобы сгладить влияние прерываний потока, в старых конструкциях одноплунжерных насосов использовали *демпферы пульсаций*, представлявшие собой трубки достаточно большого объёма между насосом и инжектором. Сам по себе объём такой трубки, а также небольшая, но ненулевая сжимаемость элюента обеспечивали постоянство скорости потока, пусть и несколько сниженной. К сожалению, такая конструкция оказалось неприемлемой для градиентного режима из-за непроизводительного в хроматографическом смысле холостого объёма.

Другой способ сглаживания графика скорости потока состоял в использовании компенсирующего *восстановительного плунжера*, с большой скоростью совершавшего возвратно-поступательное движение во время обратного хода основного плунжера. Это движение было рассчитано на то, чтобы создать кратковременный импульс давления, перекрывавший время обратного хода основного плунжера, и, таким образом, сгладить общие давление

и скорость потока. Такая конструкция насоса предшествовала двухплунжерной схеме.

Лучший способ избавиться от пульсаций потока – использовать двухплунжерную изократическую систему. Плунжеры находятся в двух отдельных корпусах, а их движение согласовано так, что пока один из них подаёт подвижную фазу в колонку, другой всасывает её в полость насоса из резервуара. Иначе говоря, перемещение плунжеров имеет сдвиг по фазе на 180°. Шум нулевой линии в этом случае минимален, но обслуживание такого насоса (с двумя плунжерами, двумя поршневыми кольцами и четырьмя обратными клапанами) становится более трудоёмким. График скорости потока представлен на рис. 1.7 (Б).

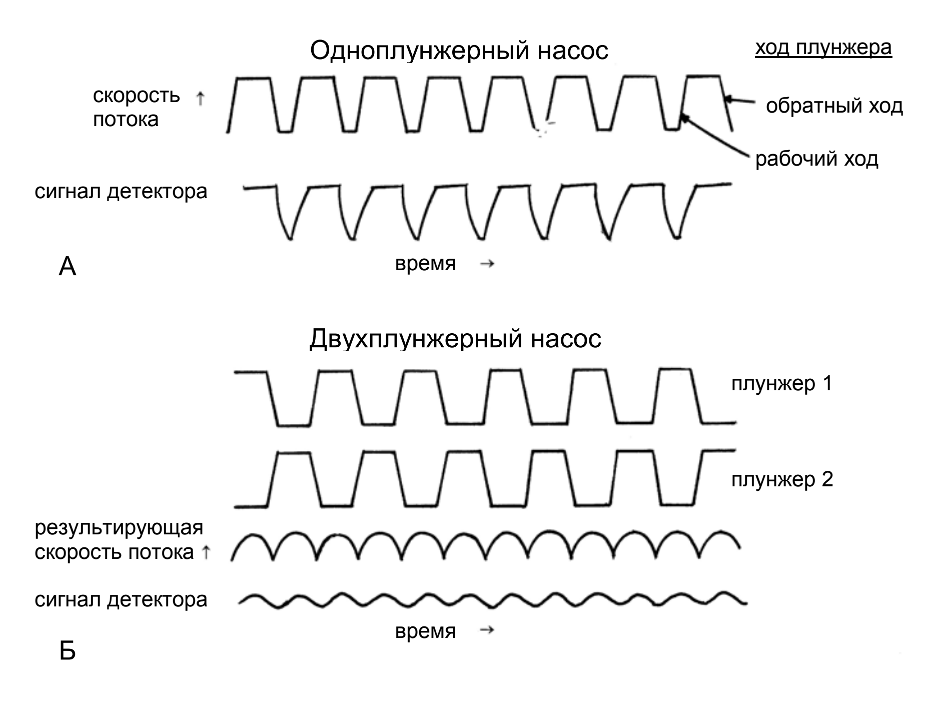


Рис. 1.7. Шум нулевой линии обусловленный работой насоса: (А) График скорости потока через одноплунжерный насос (вверху) и соответствующий сигнал детектора (внизу). (Б) Графики скорости потока для каждого из плунжеров двухплунжерного насоса (верхняя пара), результирующая скорость потока (посредине) и соответствующий сигнал детектора (внизу). Амплитуда отклика детектора зависит от того, насколько детектор чувствителен к колебаниям давления и расхода.

В современных установках для ВЭЖХ градиентный режим реализуется смешением под низким давлением в одноплунжерной системе или под высоким давлением в двухплунжерной системе. В системах смешения под низким давлением используются соленоиды, чтобы выдержать требуемое соотношение количеств элюентов из разных резервуаров. При смешении под высоким давлением используются два отдельных насосных узла с плунжерами и обратными клапанами. Самые современные насосные системы куда сложнее. По схеме они также являются двухплунжерными, однако в каждом плунжерном узле постоянно контролируется скорость потока, и любое её отклонение немедленно устраняется за счёт изменения скорости двигателя, приводящего в движение насос. В результате в современных насосах погрешность при поддержании постоянного расхода значительно менее 1 %, тогда как ещё десять лет назад она была около 2 %.

Обычно в насосном узле сверху и снизу корпуса имеются *входной* и *выходной обратные клапаны*. Их назначение в том, чтобы поток подвижной фазы протекал всегда только в одном направлении: от насоса – в колонку. Обратный клапан состоит из корпуса, двух сёдел и сапфирового шарика. Конструкция насосного узла с такими клапанами показана на рис. 1.8. Существуют также значительно более сложные конструкции, например, насосы моделей 1050 и 1100 фирмы Хьюлетт-Паккард. В этих насосах в выходной обратный клапан встроен фильтр, задерживающий частицы, образующиеся при разрушении поршневых колец или прошедшие сквозь входной фильтр и оставшиеся в растворе. Фильтры нуждаются в регулярной замене.

Поскольку между выходным обратным клапаном и колонкой может иметь место значительный перепад давления, все соединения должны представлять собой трубопроводы, способные выдержать высокое давление. Соединение между выходным обратным клапаном и инжектором обычно выполняют трубками среднего внутреннего диаметра (от 0,25 до 0,5 мм) из нержавеющей стали. Трубки большего диаметра не применяют, чтобы избежать излишнего холостого объёма, а меньшего – чтобы снизить вероятность засорения.

Во многих насосных системах между выходным обратным клапаном и инжектором помещают *датчик давления*. Этот компонент постоянно замеряет давление в системе. Величина давления выводится на манометр, аналоговый или цифровой. В каких единицах измерять давление, решает изготовитель. Чаще всего используются единицы «паскаль» (*Па*), «бар» (*бар*), «атмосфера» (*ат*) и «фунт-сила на квадратный дюйм» (*фс/дюйм*^{2}). Важно использовать единицы, принятые в соответствующей стране. Коэффициенты пересчёта внесистемных единиц в единицы системы СИ таковы:

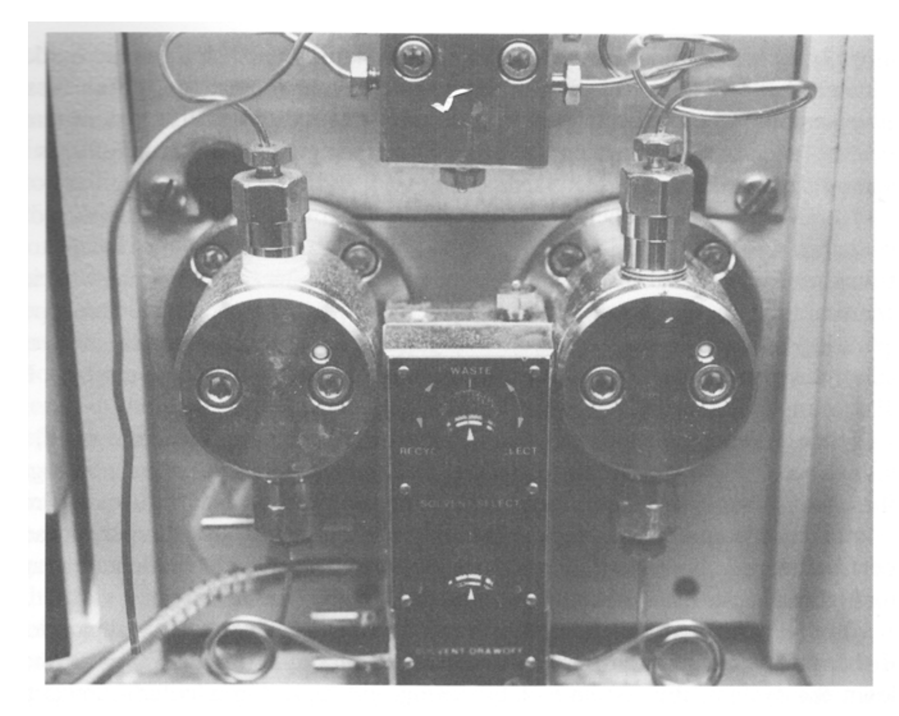


Рис. 1.8. Двухплунжерный насос. Белые кнопки в правой верхней части корпуса указывают положения плунжеров. Можно видеть, что положение обоих плунжеров в полостях корпусов почти совпадает. Однако при этом один из них подаёт в колонку, а второй – всасывает из резервуара.

1 *ат* = 98 066,5 *Па*

1 *бар* = 100 000 *Па*

1 *фс/дюйм*^{2} = 6 894,76 *Па*

Показывающий прибор, на который выводится измеряемый перепад давления в насосной системе, может быть проградуирован в любой из указанных единиц. Изготовители же колонок почти все предпочитают указывать перепад давления на колонке в барах или фунт-силах на квадратный дюйм.

В нормально работающей установке для ВЭЖХ наибольший перепад давления возникает на колонке. Следовательно, размещение датчика давления между насосом и инжектором позволяет измерять давление *на входе* в колонку (на фитинге, присоединённом к инжектору). Соединительные трубопроводы и детектор обычно мало сказываются на общем перепаде

давления в системе (<< 10 %). В результате давление на выходе колонки зачастую близко к атмосферному, иначе говоря, давление на колонке падает почти полностью.

В результате любые заметные (> 10 %) изменения перепада давления в системе при неизменных условиях работы говорят о том, что в ней что-то существенно изменилось. Скорее всего, что-то произошло с колонкой. Небольшие изменения заметить труднее, и вызвавшие их изменения в системе могут также быть незначительными. Зачастую их невозможно отличить от обычных флуктуаций, обусловленных температурой и тому подобными факторами. Тем не менее, не стоит оставлять без внимания даже такие изменения, поскольку и они могут оказаться полезными для обнаружения нештатных ситуаций.

Безопасность работы системы обеспечивается предельным давлением, выше которого реле датчика давления отключает насос. Это препятствует затиранию плунжера, возникновению внутренних течей, разрыву муфтовых соединений. Важно также уделять особое внимание наибольшему допустимому давлению на колонке. Иными словами, максимальное рабочее давление, на которое программируют насос, должно быть существенно ниже наибольшего допустимого давления *системы в целом* (то есть, по сути, колонки). Во всех случаях следует обращаться к техническим характеристикам, указанным изготовителем.

Хотя детекторы по большей части мало влияют на общий перепад давления в системе, важно помнить, что и для них имеется *наибольшее допустимое* рабочее давление. Поэтому советуем выход детектора соединять с ёмкостью для отработанного элюента трубкой большого внутреннего диаметра. Если несколько детекторов включаются последовательно, следует обращать особое внимание на правильный порядок их следования (детектор, выдерживающий самый высокий перепад давления, нужно помещать перед остальными).

Колонка в сочетании с подвижной фазой выполняет разделение анализируемых веществ. Хотя колонка располагается в хроматографе дальше от насоса по схеме, сравнительно высокие расходы на её замену заставляют дополнять систему ВЭЖХ различного рода защитными компонентами. Повреждение колонки определяется любыми условиями, вызывающими такие необратимые изменения состояния поверхности колонки, при которых меняются форма, разрешение или время выхода пиков. Из числа компонентов аппаратуры для ВЭЖХ вызвать повреждение колонки могут элюент, насос и проба.

Совместимость элюентов с колонками является, скорее, правилом, чем исключением. Однако в некоторых случаях приходится использовать агрессивные элюенты (т.е., такие, которые могут быстро вызвать необратимое повреждение). В некоторых случаях серьёзные нарушения работы могут вызывать имеющиеся в элюенте примеси. Приведём некоторые примеры подобных сочетаний элюентов и колонок.

1. Буферы, кислотные или основные, из-за которых pH элюента > 8 или < 2, при использовании с колонкой на силикагеле.
2. Элюенты с различным содержанием воды при использовании с колонкой на непривитом силикагеле или немодифицированной окиси алюминия.
3. Сополимеры полистирола и нестабилизированный тетрагидрофуран (ТГФ), содержащий пероксиды, которые вступают в химическую реакцию с полимером.

Чтобы защитить колонку от агрессивных элюентов, либо особым образом подготавливают растворители (например, сушат перед использованием на силикагеле или окиси алюминия, или стабилизируют, как в случае с ТГФ, перед использованием с сополимерами полистирола), либо используют *насыщающую колонку*. Эта колонка содержит материал, сходный с используемым в основной, аналитической колонке: если в аналитической колонке содержится октилсиликагель (C_8), то и в насыщающей колонке должен быть октилсиликагель. Главное отличие её от аналитической состоит в том, что в насыщающей колонке размер зерна больше и имеет более широкое распределение. К тому же, хотя площадь поверхности материала насыщающей колонки должна быть достаточно большой, чтобы обеспечить взаимодействие с подвижной фазой, распределение размера пор также может быть широким.

Выбор такого материала и собственно применение насыщающей колонки в системе основаны на том, что подвижная фаза растворяет набивку предколонки. Это – колонка, которой жертвуют, чтобы насытить подвижную фазу растворённым материалом набивки. В приведенном примере используют октилсиликагель, чтобы насыщенная им подвижная фаза не так быстро растворяла набивку дорогостоящей аналитической колонки. Чтобы насыщающая колонка работала эффективно, площадь поверхности её материала должна быть большой, т.е. этот материал должен обладать высокой пористостью. Большой размер зерна материала выбирается по следующим соображениям: во-первых, его стоимость в 10 – 20 раз меньше, чем материала аналитической колонки, во-вторых насыщающую колонку легко заполнить и заменить набивку сухим способом (вручную), в-третьих,

перепад давления при прохождении подвижной фазы через насыщающую колонку мал. Заметим, что требование к малому перепаду давления является довольно существенным обстоятельством, поскольку в некоторых случаях насыщающую колонку помещают до датчика давления и перепад давления на ней не контролируется. Независимо от сказанного, из этой колонки следует регулярно удалять набивку, чистить или заменять колонку и фитинги, после чего набивать насыщающую колонку свежим материалом.

Физическое повреждение аналитической колонки может иметь место, если структура материала набивки в колонке изменяется. Это может произойти при механическом ударе, например, вследствие падения колонки, или скачкообразном повышении или падении расхода. К физическому повреждению может также привести скапливание микрочастиц на входе в колонку. Такие микрочастицы чаще всего встречаются в элюентах, приготовленных с использованием буферных растворов и модификаторов подвижной части, приготовленных из твёрдых веществ (например, калий-фосфатные буферы или додецилнатриевые ион-парные реактивы). Такие элюенты весьма целесообразно профильтровать перед использованием. Микрочастицы также образуются при затирании плунжера насоса и истирании поршневого кольца. Подвижная фаза подхватывает их и уносит в колонку.

Для того чтобы исключить попадание в инжектор и колонку жидкостного хроматографа микрочастиц, образующихся в подвижной фазе или за счет разрушения уплотнения плунжера, используют *фильтр, устанавливаемый в капиллярном трубопроводе*. В таком фильтре, как правило, имеется небольшая сменная фритта (обычно из нержавеющей стали или полиэфирэфиркетона (ПЭЭК) с размером пор от 0,5 до 2,0 мкм). Фритту необходимо регулярно заменять. Пример конструкции такого фильтра показан на рис. 1.9. Материал фритты зачастую находится в пластмассовом кольце (фритта *в оболочке*), чтобы улучшить плотность сочленения фритты с корпусом фильтра под высоким давлением.

Датчик давления предназначен для измерения перепада давления в хроматографе. Непрерывный контроль давления – важный приём профилактики нарушений нормальной работы. Слишком высокое давление (на 20 % и более выше номинального) зачастую свидетельствует о наличии засорения. В более тяжёлых случаях датчик давления работает как защитное устройство: если достигается некий заданный максимально допустимый уровень перепада давления, запускается программа остановки системы (обратите внимание, что датчик давления не определяет причину повышения давления). Это предохраняет плунжер от затирания, а материал набивки – от раздавливания.

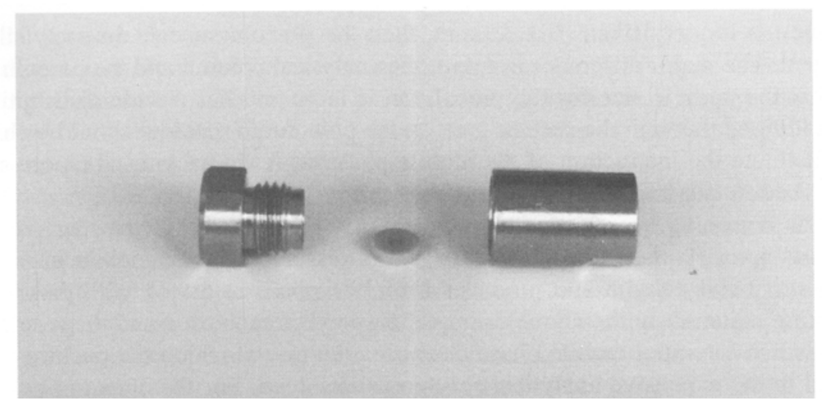


Рис. 1.9. Фильтр, устанавливаемый в потоке (увеличенное изображение): полумуфта с наружной резьбой (слева); фритта в оболочке (посредине), полумуфта с внутренней резьбой (справа).

Все рассмотренные до сих пор компоненты аппаратуры для ВЭЖХ были предназначены для приготовления и подачи в колонку элюента. Описаны также защитные устройства, помогающие предотвратить аварийный выход из строя насоса и колонки. Далее мы остановимся на том, как осуществляется ввод пробы в систему, разделение пробы на компоненты и детектирование.

Чтобы избежать терминологической путаницы, «матрица», содержащая вещества, подлежащие анализу, независимо от физического состояния (твёрдое, жидкое или газообразное) будет называться *пробой*. Проба содержит анализируемые вещества, называемые также *аналитами*. Кроме того, проба содержит неконтролируемые в процессе анализа вещества, которые в совокупности будут именоваться *примесями*. Проба представляет собой либо исходную матрицу, растворённую в жидкости, либо жидкость, содержащую аналиты после некоторой последовательности этапов пробоподготовки. Как только проба приобретает вид, пригодный для анализа, её вводят в подвижную фазу с помощью *устройства ввода пробы*, также называемого *инжектором*.

Инжектор с большой точностью отмеряет определённый объём пробы перед вводом в подвижную фазу. Ручной инжектор включает петлю-дозатор и приёмник для иглы шприца (рис. 1.10). Проба вводится в инжектор с помощью шприца-пробоотборника. У разных изготовителей инжекторов различаются внутренний диаметр иглы, её длина и форма шприца (рис. 1.11). Следовательно, правильно ввести пробу в инжектор можно только шприцем, предназначенным специально для этого инжектора.

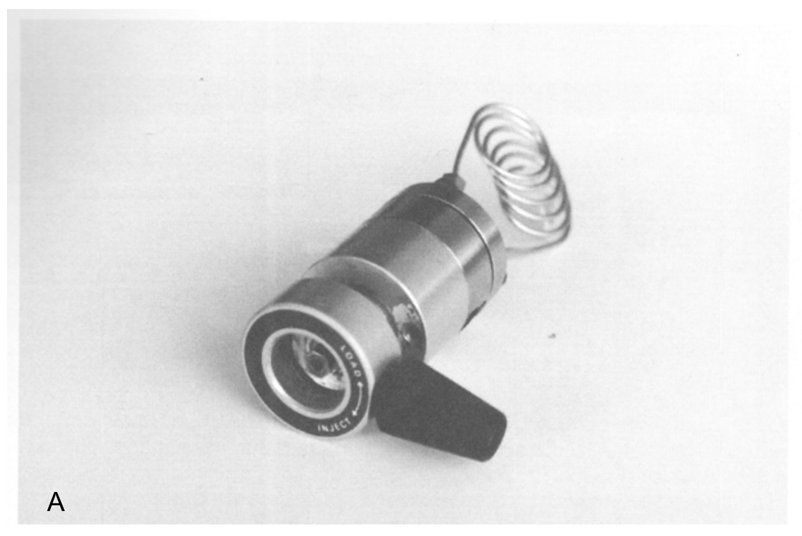


Рис. 1.10. Ручной инжектор. (А) Канал инжектора находится по оси подпружиненного рычажка для ввода. Корпус и ротор находятся непосредственно за рычажком. Статор – наиболее удалённая деталь инжектора, к которой присоединена петля (продолжение на следующей странице).

Шприц-дозатор состоит из трёх частей: иглы, через которую отбирается и подаётся проба, прецизионного цилиндра (часто стеклянного), в котором проба содержится, и притёртого к цилиндру поршня, при перемещении которого проба всасывается в цилиндр или выталкивается из цилиндра. Как правило, поршни шприцев выполнены из нержавеющей стали или металла с фторопластовым наконечником. Выбор поршня определяется природой образца (например, работа с коррозионно-активным веществом предполагает выбор поршня с фторопластовым наконечником). Поршень притирают к цилиндру в процессе изготовления, чтобы при работе вещества пробы не просачивались мимо поршня в тыльную часть цилиндра. Дело в том, что такое просачивание приведёт к загрязнению последующей пробы веществом предыдущей. Заменять отдельно поршень или отдельно цилиндр не рекомендуется.

Игла шприца может быть съёмной или несъёмной. Шприц со съёмной иглой гораздо легче чистить, а если игла засорилась, её можно заменить на новую. Шприцы с несъёмной иглой дешевле, но чистить их труднее. А чистить шприц нужно регулярно, поскольку от этого зависит воспроизводимость результатов.

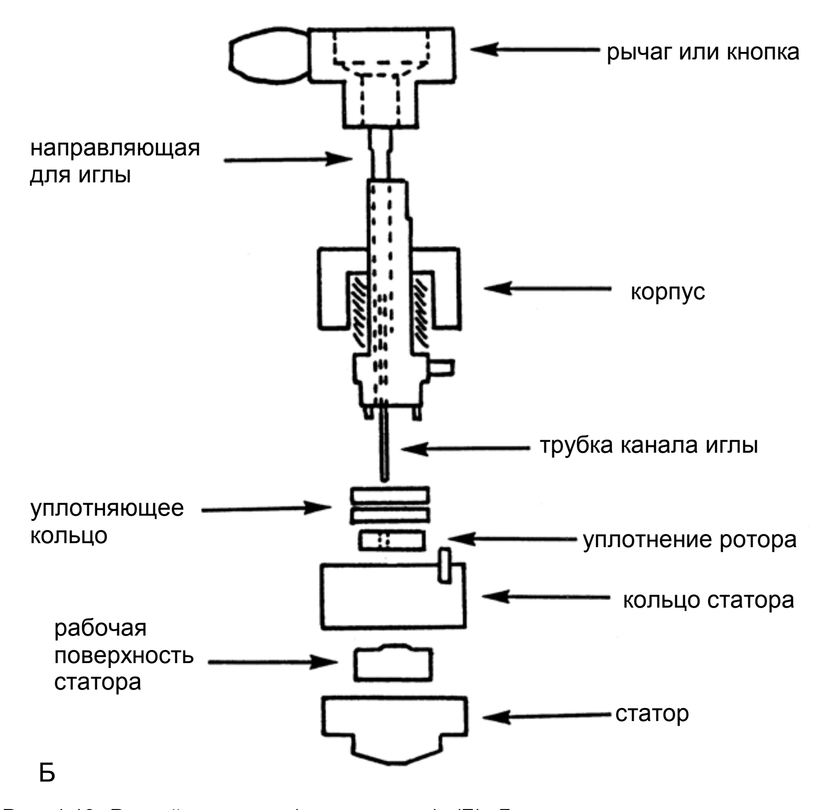


Рис. 1.10. Ручной инжектор (продолжение). (Б). Детали конструкции ручного инжектора фирмы Реодайн.

Коммутация петли инжектора осуществляется так, что петля либо выводится из потока подвижной фазы, и при этом в неё вводится проба, либо вводится в поток, так что проба вымывается из петли подвижной фазой. Этот процесс называется *инжекцией* или *вводом пробы*. Далее проба подаётся из инжектора через соединительный трубопровод в колонку. Высокая точность достигается в случае переполнения (промывкой) петли. Если петля не заполняется, точность ввода пробы определяется точностью шприца и воспроизводимостью процесса заполнения петли.

В автоматических устройствах подготовки и ввода пробы (и в автоматических инжекторах) роль петли играет сама игла (рис. 1.12). Устройство работает по следующему циклу: промывка (чистым элюентом), промывка (пробой), отбор (известного количества пробы) и ввод.

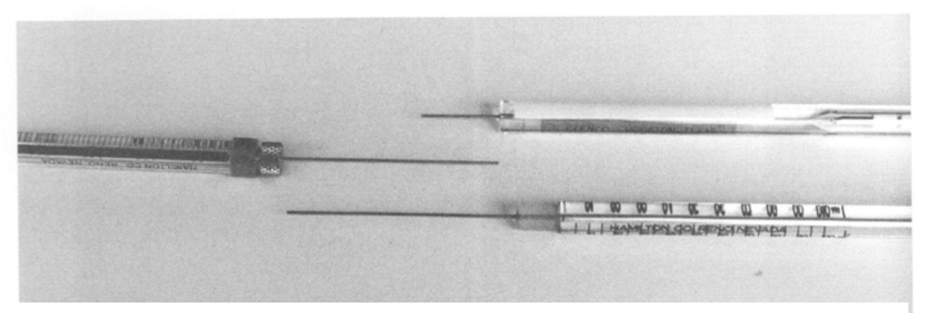


Рис. 1.11. Шприц-дозатор должен соответствовать каналу инжектора. Следует обратить внимание на различия в длине и форме. Шприцы предназначены для инжекторов разных фирм-изготовителей и не являются взаимозаменяемыми.

Обратите внимание, что применение таких инжекторов предполагает использование дополнительного флакона с промывным растворителем. Этот растворитель должен быть химически совместим и допускать смешение как с веществом пробы, так и с подвижной фазой. Автоматические инжекторы отличают превосходные точность и сходимость (часто не хуже 0,2 %). Современные модели автоматических устройств подготовки и ввода пробы могут с высокой точностью выполнять разведение пробы, добавление реактивов, нагревание или охлаждение пробы перед вводом. Хотя автоматические инжекторы и автоматические устройства подготовки и ввода пробы дороги, достигаемая с их помощью автоматизация весьма ценна, поскольку освобождает хроматографиста от постоянной рутинной работы.

Пробы могут содержать микрочастицы или растворимые компоненты, которые необратимым образом загрязняют колонку. Такого рода примеси приводят к быстрому ухудшению параметров колонки. Зачастую достаточно предварительно профильтровать пробу, чтобы удалить микрочастицы. Выбор материала фильтра определяется его совместимостью с растворителем пробы. Важно также, чтобы корпус фильтра был выполнен из химически инертного материала. Дополнительным критерием применимости того или иного фильтра для данного вида анализа является уверенность в полноте прохождения через него анализируемых веществ. Такая уверенность должна быть доказанной экспериментально, а не умозрительной.

Иной способ удаления примесей, взвешенных или растворённых в пробе, состоит в применении *защитной предколонки* (далее – просто «предколонки»). Предколонку, которая является своего рода коротким продолжением аналитической колонки, помещают между инжектором и колонкой. Предколонка, заполненная тем же по размеру и составу материалом, что и аналитическая, защищает последнюю от примесей, содержащихся в пробе.

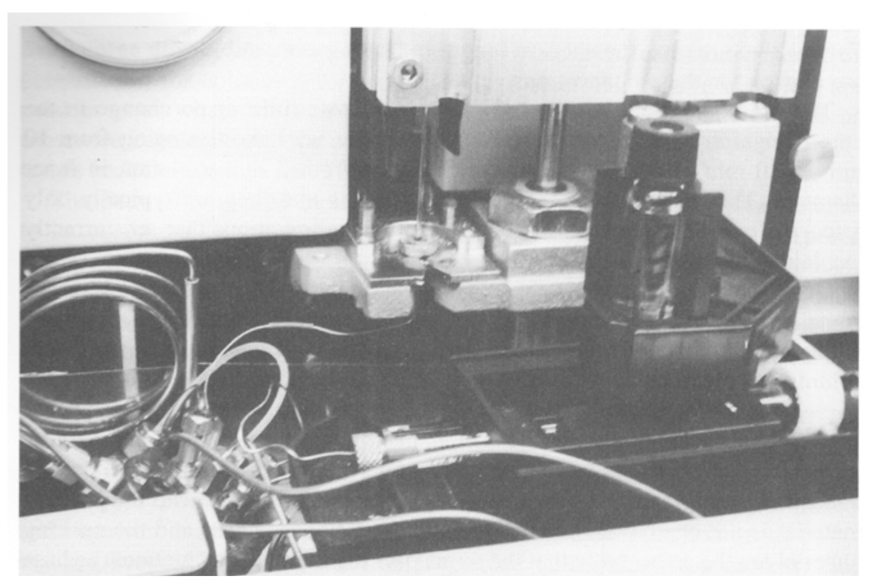


Рис. 1.12. Автоматический инжектор. Манипулятор переносит флакон с пробой (справа) в инжектор. Игла показана посредине сзади, шприц – посредине снизу.

Некоторые изготовители выпускают сборки, в которых предколонка навинчивается на аналитическую или ввинчивается в неё.

Предколонку присоединяют к инжектору капиллярной трубкой из нержавеющей стали, как правило, малого диаметра (например, 0,18 мм). Таким же капилляром предколонка присоединяется к колонке, а та – к детектору. В этих соединениях применять капилляры большего диаметра нерационально, поскольку это приводит к увеличению «мертвого объёма» системы, а значит, к снижению общей эффективности. По этим же соображениям стараются делать эти капилляры как можно короче, лишь бы это не затрудняло обращение с ними.

Наличие предколонок слабо сказывается или вовсе не сказывается на хроматографических параметрах, поскольку в большинстве случаев они имеют крайне малые длину – от 10 мм до 30 мм – и внутренний диаметр – от 2 мм до 4 мм. Преимущество использования предколонки в том, что она, как правило, в 5 – 20 раз дешевле аналитической. Примеры выпускаемых в настоящее время предколонок показаны на рис. 1.13.

Когда проба попадает в колонку, она взаимодействует с *набивкой (сорбентом)* – особым материалом, содержащимся в колонке (аналогичным материалом заполнены насыщающая колонка и предколонка).

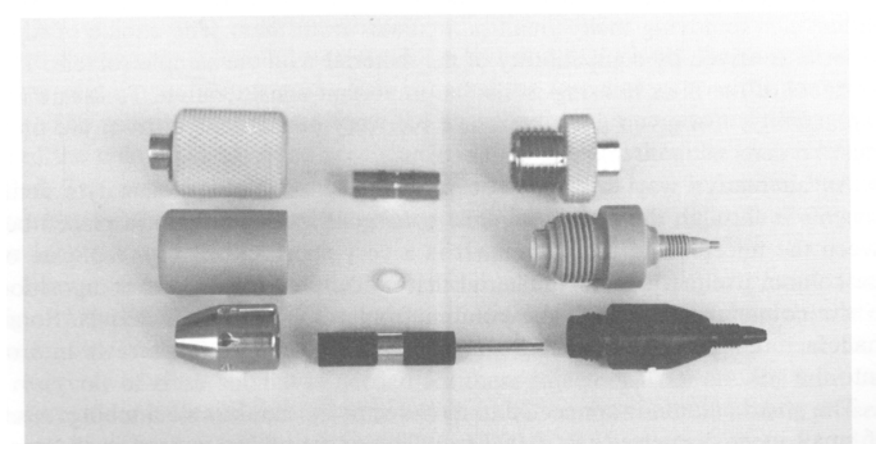


Рис. 1.13. Три варианта исполнения защитных предколонок. Вверху – обычная колонка патронного типа в держателе. Посредине деталь, напоминающая фритту, на самом деле является гофрированной фторопластовой пластинкой с набивкой. Внизу – колонка особого патронного исполнения, которая вставляется в специальный держатель.

Более чем в 75 % случаев в настоящее время набивкой является материал на основе пористого сферического силикагеля. Хотя в некоторых случаях силикагель используется как набивка без дополнительной обработки, в большинстве случаев он подвергается химической модификации, чтобы получить поверхности с весьма различными полярностью и функциональными группами. Функциональные группы, привитые к поверхности, называются в совокупности *неподвижной фазой*. Если материал набивки не подвергался химической модификации, то неподвижная фаза и набивка – одно и то же. Однако термины «набивка» и «неподвижная фаза» не следует путать.

Набивку помещают в трубку определённых длины и внутреннего диаметра. По обоим концам трубки имеются особые концевые фитинги, удерживающие набивку внутри. Набивка и металлические детали в совокупности образуют колонку. Именно в колонке происходит хроматографическое разделение. Хотя конструкция и внешний вид колонок разных изготовителей могут различаться достаточно сильно, многие их детали совпадают. На рис. 1.14 показаны трубки для колонок типичных диаметров. Чаще всего детали колонки выполняют из нержавеющей стали марки 316. Другие материалы используют в тех случаях, когда сталь разрушается (коррозионно-активной подвижной фазой) или мешает процессу разделения и количественного определения. К таким материалам относятся титан и ПЭЭК.

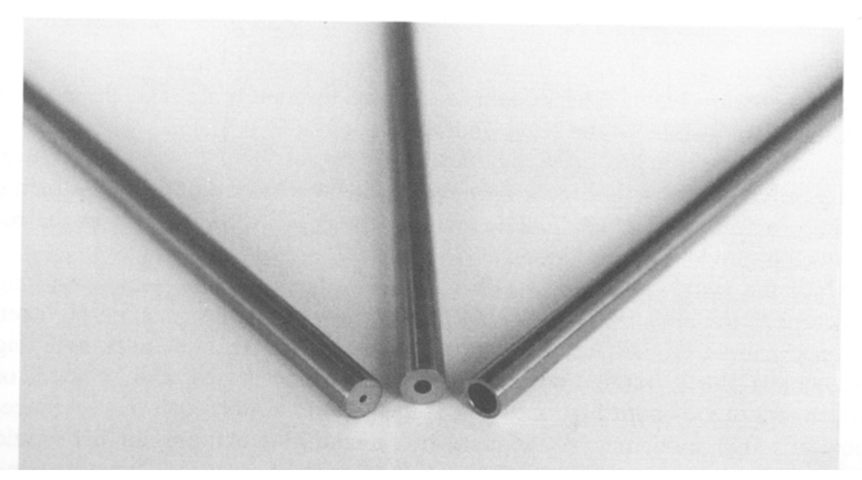


Рис. 1.14. Трубки для колонок наружным диаметром 6,35 мм (1/4 дюйма) с различными внутренними диаметрами. Слева направо: 1,0 мм (микротрубка); 2,1 мм (тонкая трубка); 4,6 мм (аналитическая).

Колонка состоит из двух концевых фитингов (с их помощью колонка подключается в систему, они также образуют герметичное обжимное соединение), двух фритт (пористых, проницаемых для подвижной фазы, но удерживающих набивку в колонке), трубки (цилиндра, внутри которого содержится набивка) и собственно набивки. Наилучшие хроматографические параметры дают трубки с наименьшей (микронной) шероховатостью торцов колонки и столь же высокой точностью их перпендикулярности оси.

То, как организован процесс заполнения колонки, по важности уступает, пожалуй, только выбору материала набивки. На рис. 1.15 показана незаполненная колонка, присоединённая к приспособлению для заполнения суспензией с подачей снизу вверх. Для заполнения колонки материал набивки смешивают с растворителем, дегазируют с образованием суспензии (так, чтобы не происходило комкования, и материал набивки оставался во взвешенном состоянии в течение всего процесса) и заливают в резервуар, который затем герметически закрывается, чтобы исключить утечку при повышении давления.

Набивочный насос заполнен *вытесняющей жидкостью* или набивочным растворителем. Резервуар с суспензией присоединён к насосу через отсекающий клапан. При закрытом клапане осуществляется нагнетание с помощью насоса до достижения требуемого для заполнения колонки давления.

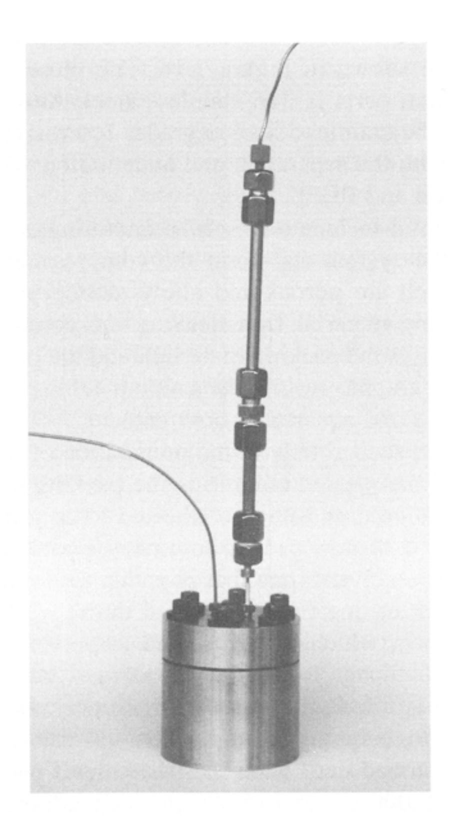


Рис. 1.15. Приспособление для заполнения колонки: традиционная конструкция с подачей суспензии снизу вверх. Набивочная головка – внизу показан узел из двух частей, соединённых винтами. Слева – входной патрубок с трубопроводом от насоса. Вверху над головкой – заполняемая колонка, над ней – трубопровод для сброса отработанного материала. Конструкция выдерживает давление свыше 70 МПа (10 000 фс/дюйм2).

В зависимости от размера зёрен материала набивки и длины и внутреннего диаметра колонки, это давление может быть от 35 МПа (5000 фс/дюйм^2) до 105 МПа (15 000 фс/дюйм^2) и выше. Затем клапан открывают, и высокое давление быстро проталкивает материал набивки в колонку. Систему выдерживают до уравновешивания, набитую колонку снимают и устанавливают на неё второй концевой фитинг.

Для обеспечения воспроизводимости при заполнении колонок важно контролировать ряд переменных: давление при заполнении, продолжительность, плотность растворителя в суспензии, уровень материала набивки в суспензии, объём резервуара, а также использовать один и тот же растворитель в качестве вытесняющей жидкости.

Структура материала набивки после заполнения колонки называется *уплотнённым слоем*. С заполненной колонкой следует обращаться крайне осторожно, чтобы не нарушить уплотнённый слой. Не допускаются

механические удары, резкие повышения и понижения расхода, демонтаж или подгонка концевых фитингов и фритт. Если колонка нуждается в ремонте (например, замене фритты), в процессе демонтажа фритты и её замены необходимо свести к минимуму перемещение концевого фитинга, примыкающего к фритте. В некоторых случаях при замене происходит высыпание части материала набивки, вследствие чего колонка нуждается в дозаполнении. При этом надлежит использовать в точности такой же материал набивки.

В настоящее время используют две принципиально различные конструкции фитингов колонок. Классическая конструкция концевого фитинга с обжимным соединением (рис. 1.16) включает муфту, фритту, гайку и обжимную втулку (цельную или двухкомпонентную). Фритта находится внутри фитинга и может быть съёмной или несъёмной. Материал фритты может занимать всё сечение или находиться в оболочке (рис. 1.17).

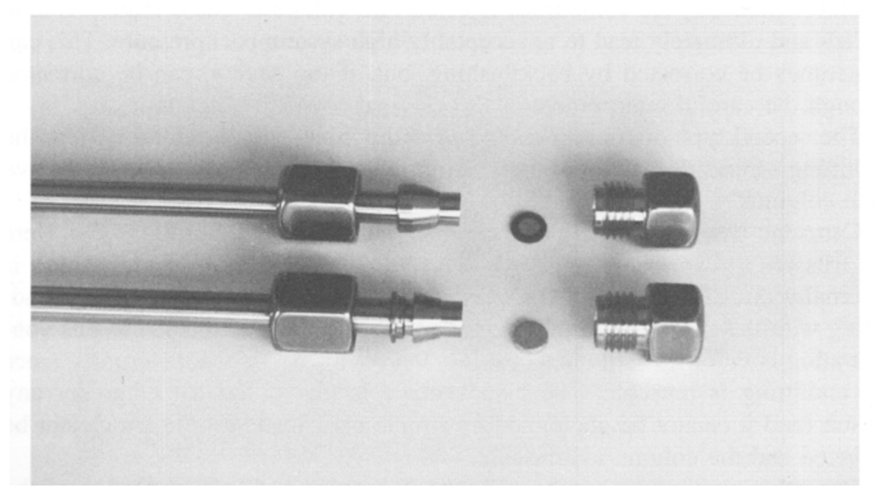


Рис. 1.16. Колонки с обжимным соединением концевых фитингов. Вверху: цельная втулка, фритта в оболочке. Внизу: двухкомпонентная втулка и обычная фритта.

Герметичность соединения трубки колонки с концевым фитингом по высокому давлению достигается обжимом втулки вокруг трубки при свинчивании гайки с муфтой. При этом фритту устанавливают заранее, так что в процессе монтажа обеспечивается надлежащее расстояние. Поверхность контакта обжимной втулки с трубкой создаёт герметичное соединение, не допускающее течи. Вследствие этого в некоторых случаях после использования колонки оказывается, что на внешней поверхности трубки между

втулкой и гайкой концевого фитинга образуется тончайший слой материала набивки. Обычно на хроматографические параметры это не влияет (если, конечно, в соединении нет утечки элюента или материала набивки). А вот просачивание набивки наружу между концевым фитингом и трубкой колонки является признаком неисправности, которую следует незамедлительно устранить.

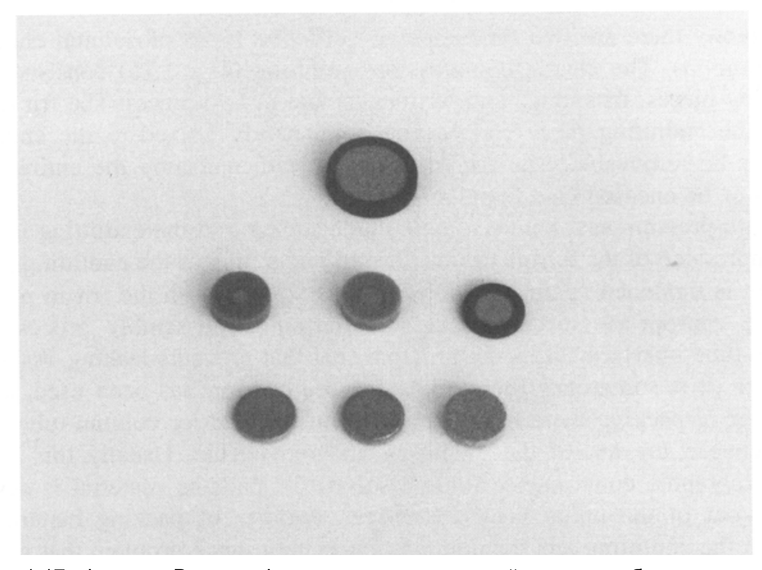


Рис. 1.17. Фритты. Вверху: фритта из нержавеющей стали в оболочке, наружный диаметр 7,5 мм; посредине: фритты из нержавеющей стали различного внутреннего диаметра и толщины в оболочке, наружный диаметр 4,6 мм; внизу: фритты из нержавеющей стали различной толщины, наружный диаметр 4,6 мм.

Недостаток обжимного соединения состоит в том, что при обжиме втулки вокруг трубки колонки последняя деформируется внутрь и воздействует на уплотнённый слой. Чаще всего этим можно пренебречь, однако, если трубка тонкостенная или при сборке концевого фитинга был приложен слишком большой крутящий момент, этот фактор может привести к нежелательным последствиям. Деформирование трубки с набивкой вызывает нарушение уплотнённого слоя, а значит, ухудшение параметров колонки. Следует также помнить, особенно при подготовке заказа, что муфты фитингов выпускаются как с наружной, так и с внутренней резьбой (рис. 1.18).

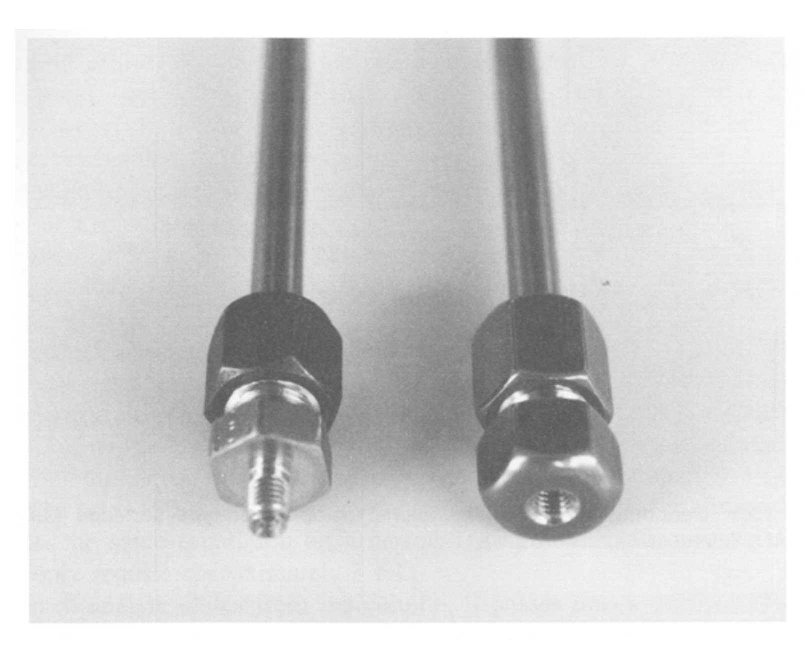


Рис. 1.18. Концевые фитинги с обжимным соединением: с наружной резьбой (слева) и с внутренней резьбой (справа).

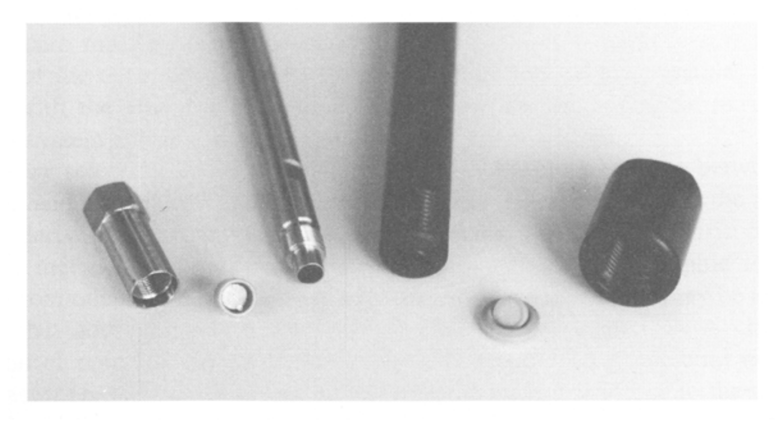


Рис. 1.19. Концевые фитинги при наличии резьбы на колонке: гайка из нержавеющей стали с насадной фриттой в оболочке (слева); гайка из ПЭЭК с уплотнительным кольцом и фриттой в оболочке из ПЭЭК (справа).

Преимуществом обжимного соединения является простота замены фритты. Время от времени в колонку попадают загрязнённые пробы (с примесями микрочастиц и нерастворимых веществ). Примеси засоряют фритту, что приводит к недопустимому повышению перепада давления в системе. Иногда эту неисправность удаётся устранить обращением потока, если же это не помогает, необходимо, очень аккуратно, заменить засорившуюся фритту на новую.

Второй вариант конструкции концевого фитинга колонки – резьба на самой трубке колонки. В этом случае фитинг навинчивается непосредственно на трубку. Две такие колонки показаны на рис. 1.19.

Серийно выпускаются также колонки патронного (картриджного) типа (рис. 1.20). В этом случае фритты запрессованы в трубку колонки. На трубке имеется наружная резьба, на которую навинчивается цельный концевой фитинг. Плотность соединения обеспечивается контактом фитинга с поверхностью фритты и трубки. Преимущество такой конструкции в том, что колонка получается более дешёвой, поскольку фитинги могут использоваться многократно. Недостаток – в том, что в случае засорения фритты по любой причине (и невозможности устранения засорения обращением потока), колонка дальнейшему использованию не подлежит, поскольку заменить фритту невозможно.

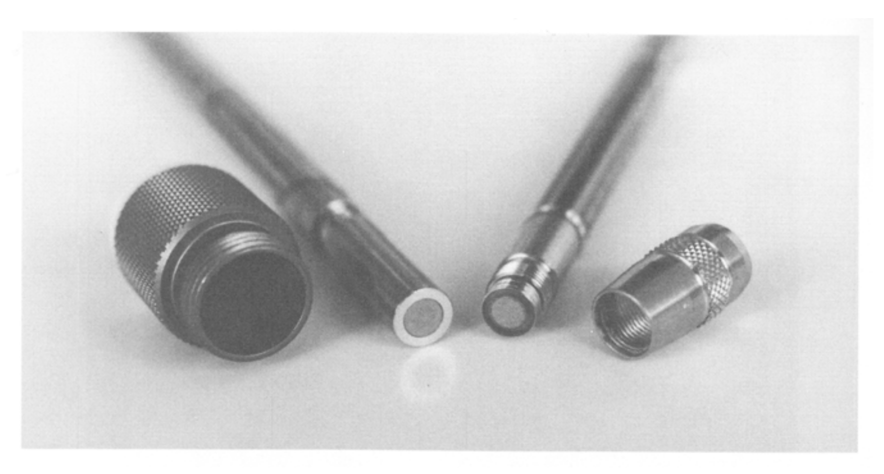


Рис. 1.20. Колонки патронного типа: с обжимным соединением (слева) и с наружной резьбой (справа).

И еще один компонент может быть добавлен в конструкцию колонки. Ближайшее рассмотрение процесса начала разделения показывает, что проба после прохождения через входную фритту попадает на вход колонки «точечно». И хотя фритта способствует радиальному распределению пробы, этот процесс не всегда является достаточно эффективным. Это приводит к возникновению двух проблем. Во-первых, это вызывает неравномерное распределение пробы в начале колонки, что приводит к искажению формы хроматографических пиков. Во вторых, неэффективное использование всей поверхности входной фритты приводит к более быстрому её засорению.

Для обеспечения радиального распределения пробы известны два подхода. Первый заключается в том, чтобы выполнить в фитинге небольшую коническую выточку. Благодаря ей проба быстро расширяется непосредственно перед попаданием на фритту. Второй – в том, чтобы поместить между фитингом и фриттой очень тонкий диск-распределитель (рис. 1.21, зачастую это сочетается с выполнением выточки). Диск-распределитель распределяет пробу в радиальном направлении, поскольку давление на его каналах снижается. Соответственно, перед попаданием на фритту поток пробы приобретает звездчатую форму.

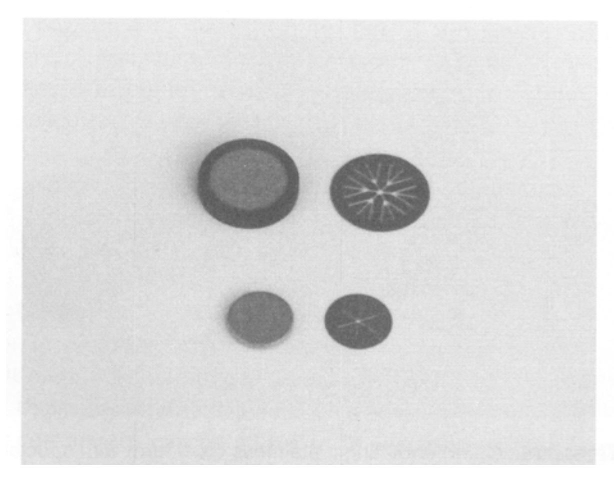


Рис. 1.21. Фритты (слева) и соответствующие диски-распределители (справа).

Пройдя концевой фитинг, проба попадает на набивку (сорбент). Именно здесь и происходит разделение. Аналиты пробы имеют различное сродство к паре подвижная фаза – неподвижная фаза. Для конкретной пары подвижная/неподвижная фаза эти различия заставляет аналиты по-разному

распределяться между подвижной и неподвижной фазой воспроизводимым образом. Соответственно, при движении подвижной фазы вдоль колонки, каждый аналит перемещается по колонке с разной (неповторяющейся) скоростью и выходит из колонки в определённый хорошо воспроизводимый момент времени.

Хотя общее время удерживания того или иного вещества и специфика его отделения от остальных определяется в основном составом подвижной фазы, колонка также определяет характер разделения. Размеры колонки зависят от сферы применения и определяются объёмом вводимых проб. В таблице 1.1 приведена классификация колонок по применению, в соответствии с их размерами, диаметрами зёрен (d_p), расходами (F), объёмами проб. От размера колонки зависит также, какое количество подвижной фазы расходуется в одном анализе. Например, если в общем случае для разделения, то есть элюирования всех аналитов, на колонке диаметром 4,6 мм, длиной 150 мм требуется 20 мл элюента, то для разделения тех же аналитов на тонкой колонке диаметром 2,0 мм длиной 150 мм потребуется лишь 8 мл.

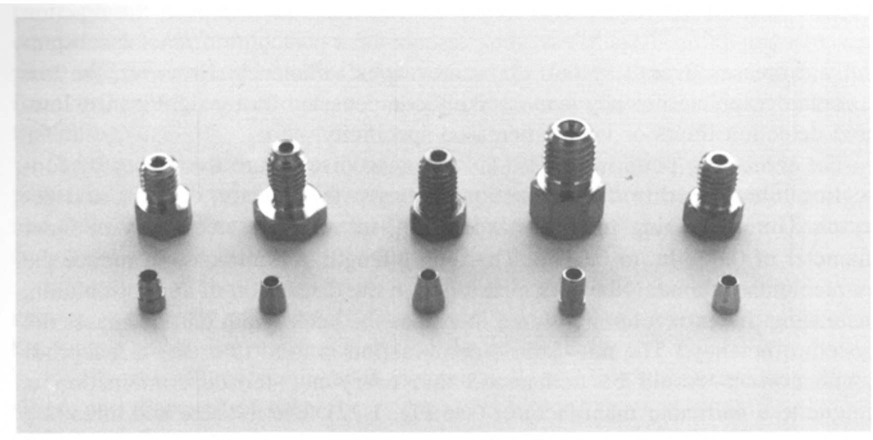
Выходящие из колонки аналиты с током элюента попадают в *детектор*. Детектор выбирают так, чтобы его отклик на каждый из аналитов был оптимальным. Детектор называют *универсальным*, если он даёт отклик на любое из проходящих по нему веществ. Таким, например, является рефрактометрический детектор Другие детекторы реагируют на специфические свойства некоторого соединения или класса соединений. Например, спектрофотометрический детектор ультрафиолетового (УФ) диапазона реагирует на хромофоры, поглощающие свет на определённых длинах волн, электрохимический детектор измеряет силу тока, возникающую при окислении или восстановлении вещества на электроде, имеющем определённый потенциал. Рефрактометрический детектор и спектрофотометрический детектор УФ и видимого диапазона (УФВ) описаны подробно в главе 3.

Несколько детекторов могут быть включены последовательно, т.е. друг за другом. Чтобы обеспечить корректную работу, необходимо располагать неразрушающие детекторы (например, флуориметрический) до разрушающих (например, масс-спектрометрического) и следить за тем, чтобы ни на одном из детекторов не был превышен допустимый перепад давления. Кроме того, если возможно, следует ставить первым детектор с наименьшим размером кюветы. Это способствует повышению общей эффективности системы.

Таблица 1.1. Классификация хроматографических колонок и типичные параметры

Класс	Применение	Внутренний диаметр, мм	Длина, см	d_p, мкм	Масса пробы	Объём пробы	F, мл/мин	N/м*
Микроколонки	Количественное определение	< 1	≥ 25	< 2	< 100 нг	≤ 1 мкл	< 0,05	> 250 000
Тонкие колонки	То же	2 – 3	3 – 30	1,5 – 5	10 нг – 10 мкг	1 мкл – 10 мкл	0,05 – 2	> 100 000
Аналитические	То же	3,5 – 5	5 – 30	3 – 10	1 мкг – 10 мг	5 мкл – 50 мкл	0,5 – 5	40 000 – 150 000
Полупрепаративные	Мелкомасштабная промышленная очистка	5 – 25	10 – 100	10 – 50	10 мг – 1 г	100 мкл – 10 мл	2 – 100	< 20 000
Препаративные	Крупномасштабная промышленная очистка	> 25	> 25	> 20	> 50 г	> 20 мл	> 100	< 5000

* N/м (число теоретических тарелок на метр) используется для оценки эффективности колонки: эффективность колонки тем выше, чем больше значение N/м.



А

Рис. 1.22. (А) Гайки (верхний ряд) и обжимные втулки (нижний ряд). Слева направо: изделия фирм Реодайн, Уотерс, Валко (Valco), Эс-эс-ай, Паркер (Parker) (продолжение на следующей странице).

В некоторых особых случаях между колонкой и детектором помещают *постколоночный реактор*. Его назначение – преобразовать аналит в производное или комплексное соединение, с целью повышения чувствительности методики, снижения порога обнаружения, устранения помех от других компонентов, присутствующих в пробе. Основным элементом реактора может быть насос, вводящий с постоянной скоростью реактивы в поток. Химическая реакция или комплексообразование с аналитом происходят в трубопроводе между тройником реактора (с помощью которого поток от насоса реактора вводится в поток от колонки) и детектором.

В тех случаях, когда постколоночная реакция получения производных (постколоночная дериватизация) протекает слишком медленно, чтобы завершиться или достичь установившегося уровня полноты до детектора, необходим дополнительный этап. Здесь постколоночный реактор может быть снабжён нагреваемым змеевиком или интенсивным источником излучения, благодаря которым скорость реакции повышается, и реакция смещается в сторону завершения. Независимо от этого, наличие постколоночного реактора приводит к заметному снижению общей эффективности хроматографической системы. Однако потерю эффективности компенсирует значительное снижение порога обнаружения или повышение специфичности метода анализа.

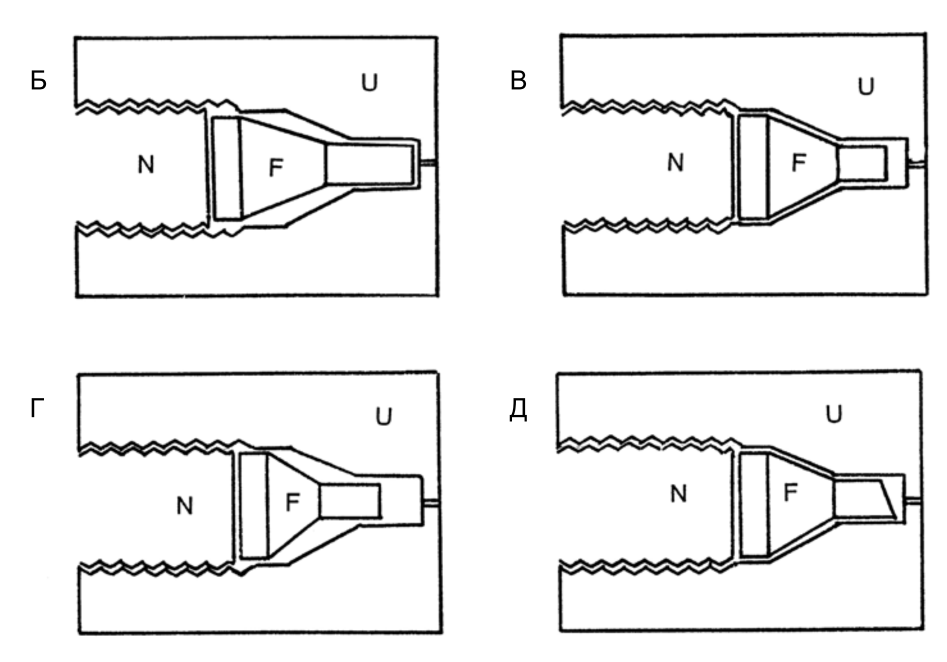


Рис. 1.22. (продолжение) (Б) Если втулка установлена неверно – возможна течь. (В) Если трубка размещена неверно образуется внеколоночная полость. (Г). Неверный выбор втулки обусловливает возможную течь и образование внеколоночной полости. (Д). Неверно отрезанная трубка (т.е. не под прямым углом к муфте) приводит к образованию внеколоночной полости.
N – гайка; F – втулка; U – муфта.

Из числа компонентов аппаратуры для ВЭЖХ осталось рассмотреть трубопроводы между инжектором, колонкой и детектором и элементы их соединения. Чаще всего для соединения используют трубки из нержавеющей стали наружным диаметром 1,59 мм (1/16 дюйма), внутренним диаметром от 0,18 мм (0,007 дюйма) до 0,25 мм (0,01 дюйм), т.е. капилляры. Длина трубопроводов должна быть как можно меньше, чтобы свести к минимуму внеколоночный объём (как уже говорилось при рассмотрении послеколоночных соединений, чем больше внеколоночный объём, тем больше размывание пиков и тем ниже эффективность системы). Для герметизации соединений используют конструкцию с обжимной втулкой и гайкой. Следует иметь в виду, что втулки и гайки разных изготовителей различаются (рис. 1.22). Размеры гайки, её резьбы, фаски обжимной втулки также могут быть различными. Кроме того, в разных узлах гайка-втулка трубка колонки выступает за торец втулки на разное расстояние. Соответственно, гайки и

втулки фирмы Уотерс (Waters) не подходят к муфтам фирм Реодайн (Rheodyne) или Эс-эс-ай (SSI). На рис. 1 22 Б–Д показано, к чему могут привести ошибка при установке обжимной втулки или попытка использовать не согласующиеся друг с другом детали.

Преимущество узла гайка-втулка из нержавеющей стали в том, что при правильном монтаже соединение остаётся герметичным до давлений 40 МПа (6000 фс/дюйм^2) и выше. Для затяжки соединения с обжимной втулкой нужно использовать гаечный ключ. Не следует, однако, прилагать избыточных усилий, поскольку это может привести к заеданию и другим неисправностям соединения. После установки втулка демонтажу не подлежит. При необходимости заменяется весь узел.

Чтобы дать заказчикам возможность не хранить множество запасных частей и уберечь их от опасности что-то перепутать, некоторые фирмы начали изготавливать цельные и двухкомпонентные узлы гайка-втулка из пластмассы (рис. 1.23). Такая обжимная втулка при монтаже принимает форму полости в муфте. Соответственно, узел совместим с любыми муфтами. Кроме того, герметичность соединения обеспечивается даже при затяжке вручную.

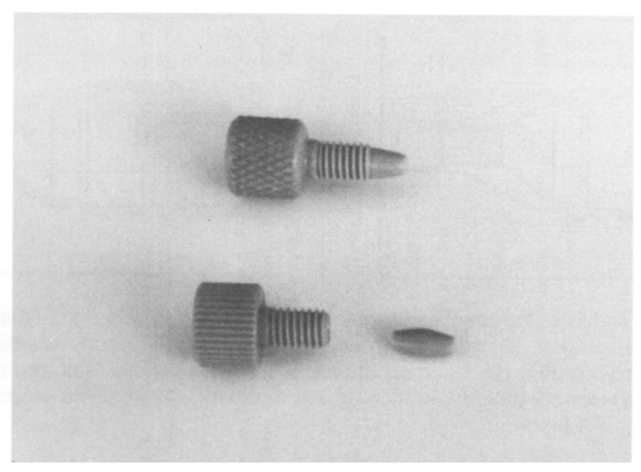


Рис. 1.23. Цельный (вверху) и двухкомпонентный (внизу) фитинги из ПЭЭК.

Недостатком таких фитингов является то, что они, как правило, рассчитаны на более низкие давления (до 28 МПа (4000 фс/дюйм^2), что, впрочем, достаточно для обычных аналитических опытов), а также то, что резьба на пластмассе может быть сорвана, если неправильно наживить муфту, при этом пластмассовая стружка попадёт на фритту колонки.

Независимо от того, какие фитинги используются, соединение нужно собирать очень тщательно, чтобы они были герметичны, и между элементами и трубками не возникал «мертвый» объём.

На последней стадии вещество из детектора поступает в ёмкость для отработанного элюента, классифицируется и утилизируется надлежащим образом.

Все перечисленные компоненты необходимы для того, чтобы правильно организовать работу и получать результаты с высокими точностью, сходимостью и воспроизводимостью.

2

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ, ПАРАМЕТРЫ, ПЕРЕМЕННЫЕ И ТЕОРИЯ

2.1. Процесс разделения, образование пиков, получение хроматограммы

Понять процесс удерживания в ВЭЖХ несложно. В случае хроматографирования одного вещества время удерживания его в колонке определяется в основном соотношением времени, которое это вещество проводит в подвижной фазе, и времени, в течение которого оно связано с поверхностью. Два предельных случая таковы:

1. Аналит совершенно не взаимодействует с поверхностью, то есть не удерживается. Внутренний объём колонки за вычетом объема сорбента и объёмный расход и определяют *время удерживания* этого вещества. Указанный объём состоит из объёма в каналах между частицами материала набивки и объёма пор в этих частицах.
2. Вещество сильно взаимодействует с поверхностью материала набивки. Оно может быть *необратимо адсорбировано* и вовсе не покинуть колонку. Либо это вещество может быть так сильно связано с поверхностью, что выйдет только спустя очень долгое время. В этом случае пик столь широк, что элюирование занимает 20 – 30 мин и даже больше. Зачастую столь сильно удерживаемые компоненты дают пики, неотличимые от нулевой линии.

Идеальный с точки зрения хроматографии случай – когда время выхода анализируемого вещества больше, чем время выхода несорбируемого вещества, например пика растворителя, но достаточно мало с точки зрения практической осуществимости и эффективности анализа (скажем, не более 15 мин). Заметим, что чем больше количество пиков на хроматограмме, которые должны быть отделены друг от друга, тем больше это предельно допустимое время. Например, хроматографический опыт с разрешением двух пиков относительно нулевой линии зачастую укладывается менее, чем в 10 мин, а опыт с пятью пиками требует свыше 15 мин.

Рассмотрим подробнее случай с двумя растворёнными веществами в пробе. Пусть вещества A и B растворены в элюенте, введены в поток подвижной фазы и внесены в колонку. Время, которое A и B проводят в каждой из фаз, различается в зависимости от того, насколько соотношение сродства вещества A к подвижной и неподвижной фазам отлично от аналогичного соотношения для вещества B. Промежуток времени, проводимый веществом в той или иной фазе, определяется константой равновесия, зависящей от того, что это за вещество, а также от состава подвижной фазы и химических и физических свойств поверхности. Если поверхность не модифицирована (например, силикагель, окись алюминия), перенос между подвижной фазой и основой называется *адсорбцией*. Если на поверхности имеется привитая фаза (например, октил, октодецил) процесс переноса называется *распределением*. Разница между ними с практической точки зрения будет рассмотрена ниже.

В большинстве случаев разделения предполагается, что равновесие анализируемого вещества между подвижной фазой и поверхностью неподвижной фазы достигается быстро и является обратимым. Следовательно, удерживание каждого из веществ непосредственно связано с равновесной термодинамикой процесса распределения. Чем более благоприятны условия взаимодействия вещества с неподвижной фазой, тем больше времени, в среднем, оно проводит на неподвижной фазе, и тем больше время удерживания. Все переменные, влияющие на это равновесие, будут также влиять на время удерживания и параметры разделения. К таким переменным относятся температура, состав подвижной фазы, материал сорбента и растворитель, используемый при пробоподготовке (если он не совпадает с подвижной фазой).

После этого короткого вступления посмотрим, как происходит в колонке разделение компонентов A и B (рис. 2.1). Первоначально как A, так и B сосредоточены в начале колонки. По мере прохождения подвижной фазы по колонке, A и B начинают перемещаться вниз. Если параметры равновесий (подвижная/неподвижная фаза) A и B различны, A и B в процессе перемещения по колонке разделяются на две отдельные зоны.

Рис. 2.1. Разделение анализируемых веществ A и B. Положение зоны компонента в аналитической колонке показано слева (столбец «Колонка»). Соответствующие хроматограммы показаны справа. Здесь t_0 – момент ввода пробы в колонку. Этап А: A и B совместно вводятся в одну и ту же зону растворителя в голове колонки. Этапы от Б до Д: A проводит больше времени в набивке и меньше – в подвижной фазе, чем B, поэтому B перемещается вдоль колонки быстрее. Этап Е: B выходит из колонки в детектор, но A всё ещё полностью находится в колонке. Этапы Ж и З: A перемещается вдоль колонки. Этап И: A элюируется из колонки. Этап К: оба аналита полностью элюированы из колонки.

А

Б

В

Г

Д

Е

Ж

З

И

К

В данном случае B, в среднем, находится в подвижной фазе дольше, чем A, и поэтому обгоняет A при движении по колонке. В конце концов B полностью отделяется от A и начинает выходить из колонки, пока A ещё находится в ней.

Когда зоны разделяемых веществ выходят из колонки, они поступают в детектор и регистрируются как *пики*. Вся кривая, которую регистрирует детектор от момента ввода пробы в колонку до полного элюирования последнего компонента пробы, называется *хроматограммой*.

Время удерживания пика анализируемого вещества определяется однозначно девятью переменными:

1. Структура (строение) молекул разделяемых веществ.
2. Состав растворителя, в котором растворена проба.
3. Объём пробы.
4. Физические характеристики и химизм поверхности материала набивки.
5. Размеры колонки (т.е. длина и внутренний диаметр).
6. Состав подвижной фазы.
7. Температура в системе.
8. Скорость потока подвижной фазы.
9. Внеколоночный объём в системе (в большинстве случаев – объём инжектора, соединительных трубопроводов и детектора).

Существенно, что для получения приемлемых результатов хроматографии можно изменять некоторые или все эти переменные. Когда же их значения выбраны, и условия работы установлены (т.е. методика разработана и прошла валидацию), время удерживания и форма пика (профиль элюирования) должны быть воспроизводимыми. Постоянный контроль параметров, связанных с пиками, – важный процесс в оперативной оценке показателей хроматографической системы.

В идеале элюируемое анализируемое вещество даёт совершенно симметричный пик. На деле же пик чаще получается асимметричным, большая его часть находится после максимума (срез) или до максимума (фронт). Если отклонение формы пика от симметричной невелико и неизменно, результаты анализа можно считать правильными. Важнее то, что форма пика и любые её изменения многое могут сказать о том, что происходит в установке для ВЭЖХ. Нельзя забывать, что избежать ошибок можно, только если отслеживать любые отклонения от нормальных условий работы и результатов.

С учётом этого, хроматограммы характеризуются рядом параметров. Эти параметры помогают определить, воспроизводимо ли функционирова-

ние системы, как проходит разделение, не выходят ли характеристики системы за допустимые пределы. В зависимости от того, какая методика ВЭЖХ используется, может потребоваться текущий контроль одного или нескольких таких параметров. Для расчёта значений контролируемых параметров в хроматографии должны быть даны некоторые определения. Этому и посвящён следующий раздел.

2.2. Параметры, используемые для описания хроматограмм

Время удерживания несорбируемого компонента, t_0. Время, за которое несорбируемое вещество (в случае эксклюзионной хроматографии – не подвергающееся разделению по размерам) проходит от инжектора до детектора. Определяется как время элюирования данного вещества путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию (рис. 2.2).

Время удерживания, t_r. Время, за которое компонент проходит всю систему от инжектора (момент ввода пробы принимается за $t = 0$) до детектора. Такое прохождение называется элюированием. Определяется путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию (рис. 2.2).

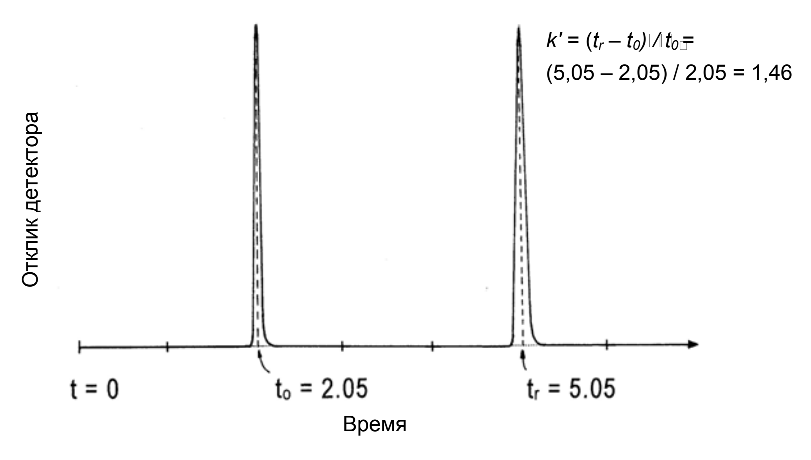


Рис. 2.2. Определение времени удерживания несорбируемого компонента, времени удерживания определяемого вещества и соответствующего коэффициента ёмкости.

Коэффициент ёмкости k'. Степень удерживания компонента, выраженная в кратности его времени удерживания к времени удерживания несорбируемого компонента по следующей формуле:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0.$$

Для пика несорбируемого компонента $t_r = t_0$, и $k' = 0$. Порядок расчёта также показан на рис. 2.2.

Высота пика h_p. Расстояние от вершины пика до нулевой линии. Нулевая линия определяется как обычный отклик детектора в присутствии подвижной фазы, но при отсутствии пробы. Нулевая линия может быть горизонтальной, как при изократическом элюировании, или наклонной, как в некоторых градиентных режимах. Поскольку зачастую высота пика линейно зависит от содержания компонента, измерение высоты пика может быть использовано для количественного анализа веществ.

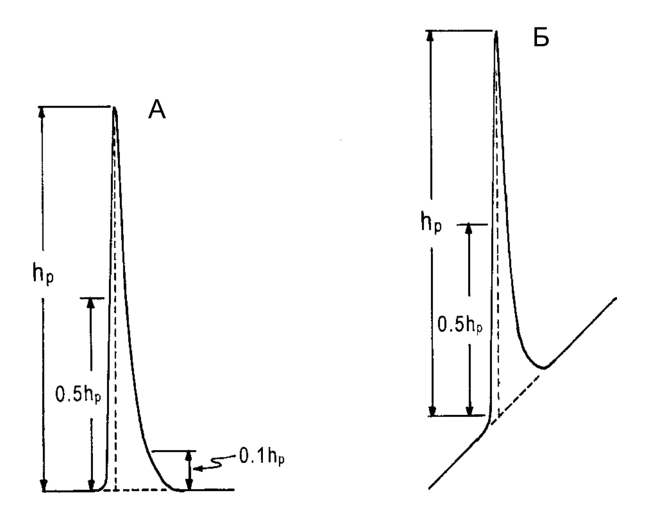


Рис. 2.3. Расчёт высоты пика h_p (в общем виде h_x). (А) показывает в общем виде форму нулевой линии в изократическом режиме, (Б) – в градиентном. В последнем случае значение 0,1 h_p, если оно необходимо, получают путём оценки, поскольку наклон нулевой линии слишком велик для непосредственного измерения.

Используются также параметры, отражающие форму пика в нескольких точках. Так, определяются 0,1 h_p или 10% h_p представляющие собой одну десятую высоты пика, измеренную от нулевой линии (рис. 2.3 А). Точка на половине расстояния от нулевой линии до вершины пика даёт полувысоту пика, 0,5 h_p (50% h_p). В случае наклонной нулевой линии, высота пика определяется, как показано на рис. 2.3 Б.

Ширина пика w_x. Ширина пика измеряется на заданной высоте пика x. Так, ширина на половине высоты обозначается $w_{0,5}$ или w_{50}. Эти параметры редко применяются сами по себе. Ширина пика используется для определения и расчёта других важных хроматографических параметров, о чём будет сказано ниже.

Число теоретических тарелок N. Число теоретических тарелок колонки является показателем эффективности разделения. По определению,

$$N = 5{,}54(t_r / t_{w_{1/2}})^2,$$

где t_r – время удерживания, $t_{w½}$ – ширина пика на половине высоты. Кроме того, N можно рассчитать по ширине пика на нулевой линии. Эта ширина измеряется между точками пересечения нулевой линии касательными, проведёнными в точках перегиба пика (рис. 2.4). Значение N при этом рассчитывается следующим образом:

$$N = 16(t_r / t_{w_b})^2,$$

где t_r – время удерживания, t_{wb} – ширина пика на нулевой линии. Обратите внимание: при одном том же времени удерживания, чем меньше ширина пика (т.е., чем уже пик), тем больше число теоретических тарелок колонки. Иначе говоря, при прочих равных, чем больше N, тем эффективнее колонка.

С точки зрения контроля нормальной работы хроматографической системы, значение N крайне важно, поскольку оно зависит почти ото **всех** параметров системы: состава подвижной фазы (поскольку состав влияет на t_r), типа, длины и внутреннего диаметра колонки (поскольку тип и размеры колонки также влияют на t_r), температуры (поскольку, как правило, чем выше температура T, тем меньше время удерживания t_r и ширина пика w), объёма пробы, всех внеколоночных объёмов хроматографической установки (трубопроводы, ячейка детектора и пр.). Впрочем, многие из этих параметров принимают неизменные значения на этапе начальной настройки аппаратуры, так что чаще N используется как характеристика именно колонки.

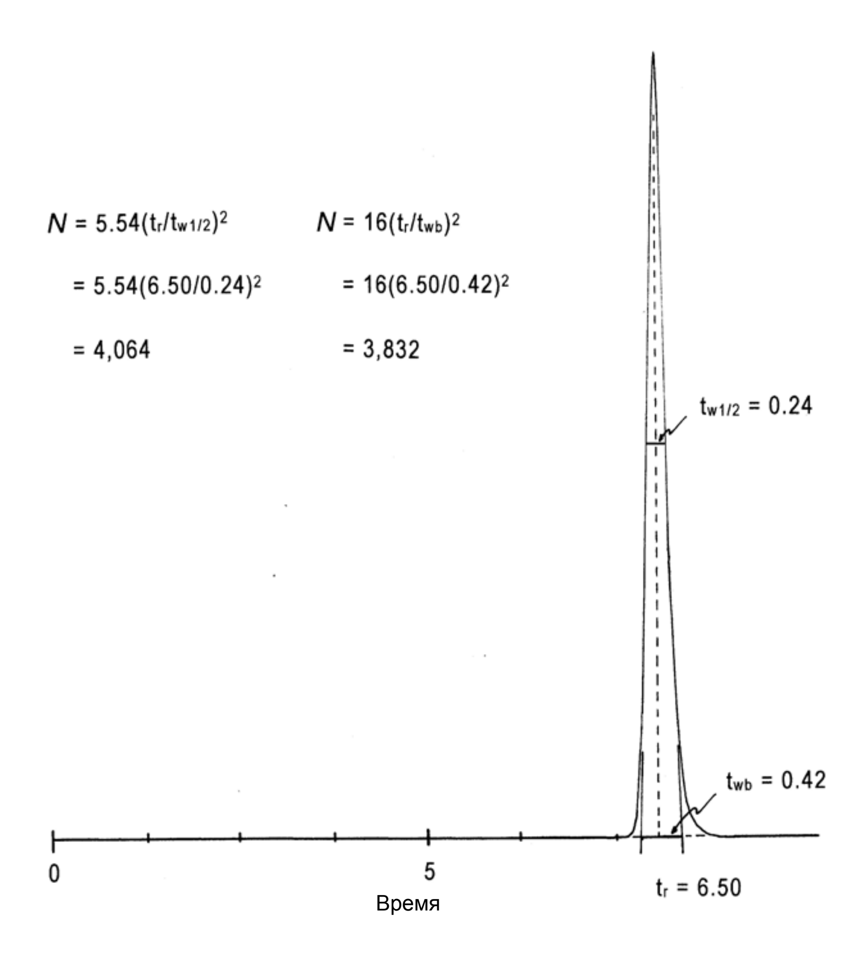


Рис. 2.4. Определение числа теоретических тарелок *N*. Ширина пика на половине высоты $x = ½$ обозначена $t_{w½}$. h_x – измеряемая доля *x* высоты пика, t_{wx} – промежуток времени, измеренный на этой высоте. Расчёты с использованием $t_{w½}$ и t_{wb} дают близкие результаты, если пик узок и симметричен. Если пик имеет удлинённый срез («хвост»), расчёт с использованием $t_{w½}$ даёт гораздо большее значение *N*, чем с использованием t_{wb}. Соответственно, значение *N* по ширине пика на нулевой линии более чувствительно к изменению параметров колонки, чем по ширине пика на половине высоты:

Высота, эквивалентная теоретической тарелке ВЭТТ или Н. *Н* представляет собой длину участка колонки, на котором имеется одна теоретическая тарелка. С помощью этого параметра можно быстро сравнить эффективность колонок разных размеров, но с равными диаметрами зёрен

сорбента (например, 25 см × 4,6 мм и 30 см × 3,9 мм с сорбентом C_{18} 5 мкм). H рассчитывается следующим образом:

$$H = L / N,$$

где L – длина колонки, N – число теоретических тарелок в колонке. Так, если в примере, показанном на рис. 2.4, L = 10 см, то H = 10 см : 4064 тарелки = 2,46 × 10^{-3} см/тарелка.

Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке ПВЭТТ или h. Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, используется в хроматографии для сравнения эффективности (т.е. качества упаковки) колонок с разными диаметрами зёрен сорбента (например, 3 мкм и 5 мкм).

$$h = H / d_p,$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, а d_p – диаметр зёрен сорбента. В рассмотренном примере диаметр зёрен 5 мкм даёт h = (2,46 × 10^{-3} см/тарелка) : (5 мкм) = (24,6 мкм/тарелка) : (5 мкм) = 4,92.

Все приведенные выше параметры характеризуют эффективность колонки на основе времён удерживания и особенностей формы отдельных пиков. Их активно используют изготовители, чтобы указывать минимально допустимые значения в паспортных характеристиках. Однако эти параметры ничего не говорят о том, насколько хорошо колонка разделяет компоненты (это определяется не только эффективностью, но и селективностью колонки). Приведенные далее параметры используются для характеристики разделения, когда на хроматограмме имеются пики двух и более компонентов.

Степень разделения α. Данный параметр используется для характеристики разделения двух соседних пиков. В идеале эти пики не должны перекрываться, то есть должны быть разрешены до нулевой линии. Это условие выполняется для пиков сходной формы, если $\alpha > 1{,}15$. Степень разделения рассчитывается следующим образом:

$$\alpha = k'_2 / k'_1,$$

где нижние индексы показывают порядок выхода компонентов (рис. 2.5). При этом всегда $\alpha > 1$.

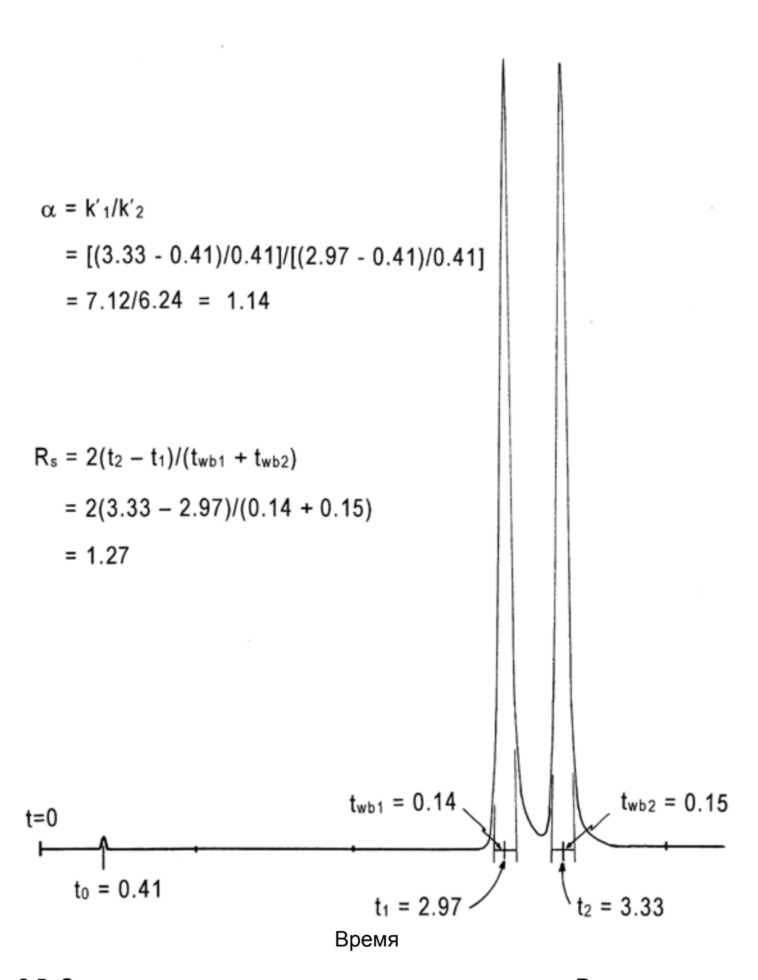


Рис. 2.5. Определение степени разделения *α* и разрешения R_s:

Разрешение R_s. Важный параметр хроматограммы более чем двух компонентов – расстояние между любыми двумя соседними пиками. Для его оценки может, например, быть использовано разрешение R_s, определяемое как

$$R_s = 2\frac{t_2 - t_1}{t_{w_{b2}} + t_{w_{b1}}},$$

где t_1 и t_2 – времена удерживания первого и второго пиков, t_{wb1} и t_{wb2}, соответственно,– ширины этих пиков на уровне нулевой линии. Заметим, что такое же определение разрешения дано в Фармакопее США.

Разрешение также может быть выражено через собственные функциональные параметры колонки. Для этого используется следующее выражение:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}(\alpha - 1)\frac{k}{k+1},$$

где k – среднее арифметическое k'_1 и k'_2 (см. рис. 2.5). Первый сомножитель, $\sqrt{N}/4$, – мера эффективности системы. Второй, $\alpha - 1$, – мера селективности разделения. Третий сомножитель, $k/(k+1)$, – мера удерживающей силы сорбента. Таким образом, R_s возрастает, если возрастает N (повышается эффективность колонки, то есть образуются более узкие пики), возрастает α (повышается селективность колонки, то есть избирательно увеличивается время удерживания одного из компонентов по сравнению с остальными) или возрастает k (общее время удерживания компонента увеличивается, остальные параметры не меняются). Наиболее сильно сказывается увеличение α, поскольку R_s зависит от α линейно. Разрешение также пропорционально корню квадратному из числа теоретических тарелок, т.е. эффективности колонки. Время удерживания существенно сказывается на разрешении, когда k мало, но, как правило, почти не влияет на α, если k больше 5. Заметим, что когда два пика выходят близко друг к другу, они характеризуются сходными значениями N, соответственно, можно определять N по любому из них. Если это не так, применяется меньшее из двух значений.

Разрешение R (в соответствии с Фармакопеей США). Величина R используется для оценки эффективности системы и определяется следующим образом [1]:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 - W_1},$$

где t_1 и t_2 – времена удерживания пиков, выходящих, соответственно, первым и вторым, W_1 и W_2 – ширины этих пиков, определяемые как расстояние между точками пересечения нулевой линии касательными, проведёнными через точки перегиба (см. рис. 2.5, где $t_{wb1} = W_1$, а $t_{wb2} = W_2$).

Коэффициент асимметрии A_x. Коэффициент асимметрии показывает, насколько форма пика отличается от нормального распределения. Нижний индекс x указывает, на какой высоте пика определяется асимметрия. Чаще

всего используются A_{10} (рассчитываемая на 10 % высоты пика) и A_5 (на 5 % высоты пика). Иногда в нижних индексах используются десятичные дроби, т.е. асимметрия на 10 % высоты пика обозначается $A_{0,1}$. Коэффициент асимметрии находят из выражения

$$A_x = b/a,$$

где b – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до конечной точки кривой, a – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до начальной точки кривой пика (см. рис. 2.6). Если спадающая часть пика (срез) длиннее

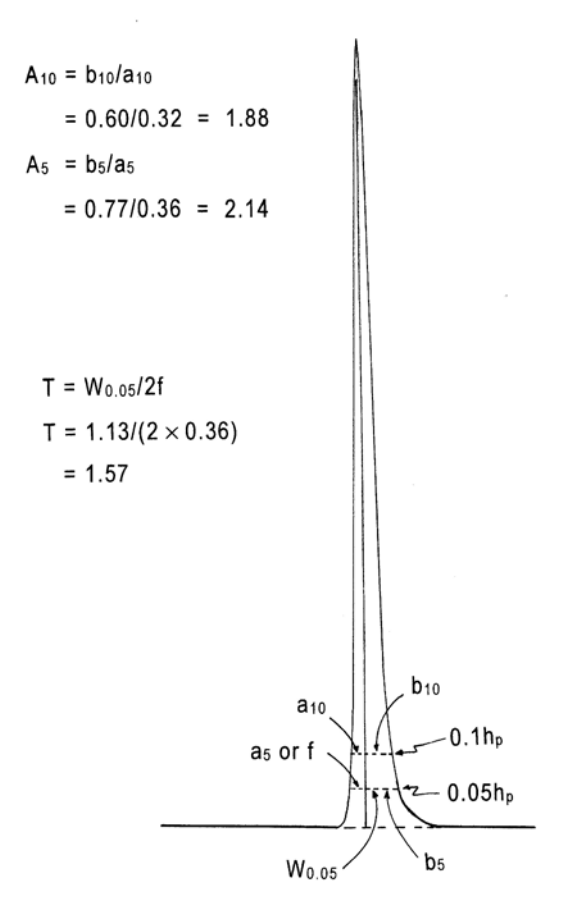


Рис. 2.6. Определение коэффициентов асимметрии A_x и коэффициента размытия T.

фронтальной, $Ax > 1$. Если фронт пика длиннее среза, $Ax < 1$. Для симметричного пика $Ax = 1$.

Коэффициент размытия T (в соответствии с Фармакопеей США). Этот параметр отличается от коэффициента асимметрии Ax и определяется на 5 % высоты пика (что обозначается десятичной дробью 0,05) как отношение общей ширины пика к удвоенной ширине фронта:

$$T = W_{0,05} / 2f,$$



Рис. 2.7. (А) Два пика хорошо разрешены на высококачественной колонке. Для упрощения восприятия нулевая линия под пиками показана пунктиром. (Б) Аналогичное разделение на той же колонке после длительного использования. Пики на хроматограмме (Б) несколько ниже, но их площади те же. Истинная форма среза первого пика показана пунктирной линией.

где $W_{0,05}$ – ширина пика на 5 % его высоты, f – расстояние от перпендикуляра, опущенного из вершины пика на нулевую линию, до начальной точки кривой пика (см. рис. 2.6). Если срез пика длиннее фронта, $T > 1$. Если наоборот, $T < 1$. Для симметричного пика $T = 1$.

Обратите внимание на то, что пики могут становиться асимметричными из-за плохого качества упаковки колонки или соединений капиллярами. Возможно, соединительный капилляр срезан не под прямым углом или резьбовые соединения не затянуты. Тогда возникает холостой объём, который плохо промывается подвижной фазой, соответственно, происходит внеколоночное размытие пиков. В особенно неудачных случаях пики могут расщепляться. Наконец, неплотные соединения могут просто протекать.

Размытие пика может сильно ограничить возможность определения времени удерживания и количественного содержания анализируемого вещества. Как правило, добиться удовлетворительной точности количественного определения можно, если соседние пики разрешены до нулевой линии. Этот случай показан на рис. 2.7 А. Здесь пик 1 достигает нулевой линии (т.е. соответствующее вещество полностью элюируется) до начала выхода пика 2. Пики имеют чёткую форму, значения как α (или R), так и A_x (или T) приемлемы, пики хорошо разрешены. На рис. 2.7 Б показан случай, когда значение α такое же, но Ax больше. Здесь хотя пики в общем разрешены, практически они перекрываются. Если в опыте предъявляются повышенные требования к количественному определению, такая хроматограмма может оказаться неприемлемой, поскольку значительная часть среза пика 1 выходит под пиком 2. Точность и правильность в таком опыте гораздо хуже, что заставляет принимать меры к устранению этого недостатка.

2.2.А. Основные уравнения, описывающие образование хроматографического пика и хроматографическое разделение

Когда проба вводится в колонку, анализируемое вещество (при упрощённом рассмотрении процесса) может находиться в двух местах – на поверхности сорбента или в подвижной фазе. По мере того, как растворённая проба перемещается вдоль колонки, имеет место длинный ряд последовательных процессов адсорбции – десорбции. Далее рассмотрены некоторые основные положения, связанные с процессом элюирования.

2.2.А.1. Изотерма адсорбции. Когда проба растворена в подвижной фазе, перемещающейся по неподвижной фазе, имеет место адсорбция

вплоть до достижения равновесия, пусть даже непродолжительного. Для описания этого события лучше всего воспользоваться изотермой. Хотя существует множество изотерм (в зависимости от того, как именно процесс описывается математически), чаще всего для несложных хроматографических разделений используют изотерму Ленгмюра. Рис. 2.8 иллюстрирует три возможных типа соотношений между концентрациями анализируемого вещества на поверхности сорбента C_s и в подвижной фазе C_m для данного сорбента.

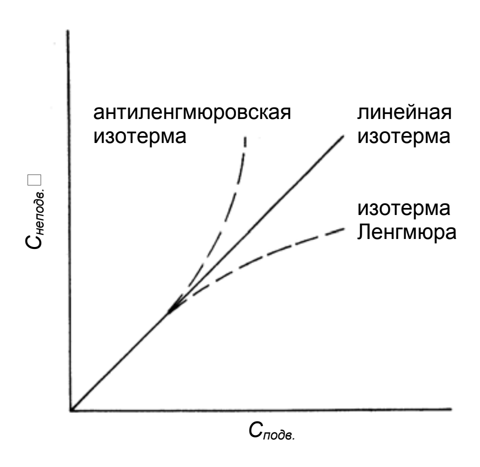


Рис. 2.8. Изотермы адсорбции. В идеале хроматографическое разделение должно осуществляться на линейном участке изотермы, поскольку при этом времена удерживания не зависят от концентрации анализируемого вещества.

1. Когда распределение растворённого вещества между поверхностью и подвижной фазой не зависит от концентрации данного вещества, изотерма является линейной (точнее, концентрация приходится на линейный участок изотермы адсорбции). Если никакие другие факторы не действуют, пик будет симметричным, а время удерживания – постоянным.
2. Диапазон концентраций, в котором при C_s растёт медленнее, чем C_m, называется изотермой *Ленгмюра*. Активные центры на поверхности насыщаются растворённым веществом, и его излишек остаётся в подвижной фазе. При дальнейшем росте концентрации доля молекул растворённого вещества, связанных с сорбентом, уменьшается, максимум пика смещается в сторону меньшего времени удержива-

ния. Одновременно не связанные с сорбентом молекулы выходят на срезе пика, удлиняя его.

3. В противоположность этому, изотерма может иметь нелинейный характер и когда сорбент фактически активируется при адсорбции растворённого вещества, то есть C_s растёт быстрее, чем C_m. Такая изотерма называется *антиленгмюровской*. В хроматографии это будет проявляться за счёт большей степени удерживания большего количества молекул растворённого вещества. Время выхода максимума пика возрастает, удлиняется фронт пика (более подробно этот вопрос рассмотрен в [2]).

2.2.А.2. Фазовое отношение. В привитофазных сорбентах имеется определённая область доступной поверхности с активными центрами, соответствующая доступному объёму. Точно так же подвижная фаза, соприкасающаяся с поверхностью, имеет некий доступный объём (именно в этих объёмах происходит перенос растворённого вещества из фазы в фазу). Соотношение этих объёмов называется фазовым отношением φ:

$$\varphi = V_s / V_m ,$$

где V_s – объём поверхностных активных центров, а V_m – объём подвижной фазы.

Важность этого понятия определяется тем, что, с учётом изотермы адсорбции, коэффициент ёмкости выражается следующим образом:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{\textit{количество вещества на поверхности}}{\textit{количество вещества в подвижной фазе}}$$

Это согласуется с вышеприведенным описанием процесса удерживания: когда растворённое вещество проводит больше времени в подвижной фазе, его относительная концентрация больше, чем в неподвижной фазе, и k' уменьшается. Когда же растворённое вещество проводит больше времени в неподвижной фазе, его относительная концентрация там больше, чем в подвижной фазе, и k' возрастает.

2.2.А.3. Уравнение Нокса. Уравнение Нокса представляет собой теоретическое описание процесса размытия хроматографической зоны. Для начала, представим себе, что бесконечно малый объём пробы введён в малую пустую трубку, ведущую непосредственно в детектор. Здесь наиболее сильно сказывается на размытии зоны (и пика) диффузия растворённого вещества от точки с наибольшей концентрацией. Это явление называется *продольной диффузией* и определяется химическим потенциалом между областями с разными концентрациями определяемого вещества.

Теперь заполним трубку пористым сорбентом. В результате появляется множество путей между зёрнами и внутри сорбента. Продольная диффузия по-прежнему имеет место, но теперь все пути имеют разные диаметры. К тому же, не совпадают ни длины путей, ни сопротивление потоку в них. Эти различия представляют собой другой источник размытия хроматографической зоны – так называемую *вихревую диффузию*.

Способствуют размытию зоны также явления, связанные с массопереносом. Эти явления можно представить себе, как обусловленные продолжительностью перемещения молекулы из точки A в точку B (как внутри фазы, так и между фазами). Далее описываются три варианта массопереноса.

Во-первых, происходит массоперенос растворённого вещества внутри подвижной фазы из одного пути потока на другой. Это называется *массопереносом в подвижной фазе*.

Во-вторых, имеет место массоперенос в области подвижной фазы между зёрнами набивки, которые не полностью промываются подвижной фазой, а также из этих областей. Это явление называют *массопереносом в застойных зонах подвижной фазы*. Следует помнить, что сюда относится не только межфазный процесс, но и процессы диффузии и массопереноса в самой подвижной фазе в застойных зонах.

Наконец, в сорбентах с большим количеством привитой фазы молекулы растворённого вещества переносятся в неподвижную фазу и из неё обратно в подвижную. Такой процесс называется *массопереносом в неподвижной фазе*. Как и в предыдущем случае, сюда относят также процессы диффузии и массопереноса в неподвижной фазе.

Опуская подробности, укажем лишь, что общая эффективность колонки в терминах высоты приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке h (чем меньше h, тем более эффективна колонка и тем уже пики), описывается уравнением Нокса [3]:

$$h = Av^{1/3} + B/v + Cv,$$

где v – приведенная линейная скорость (т.е., отношение линейной скорости потока к коэффициенту диффузии анализируемого вещества в подвижной фазе), член A описывает вихревую диффузию, член B – продольную, член C – массоперенос.

Зависимость h от v, соответствующая данному уравнению, показана в общем виде на рис. 2.9. Обратите внимание на то, что наибольшая эффективность хроматографической системы достигается на минимуме кривой. К сожалению, такая оптимальная приведенная скорость потока, v_{opt},

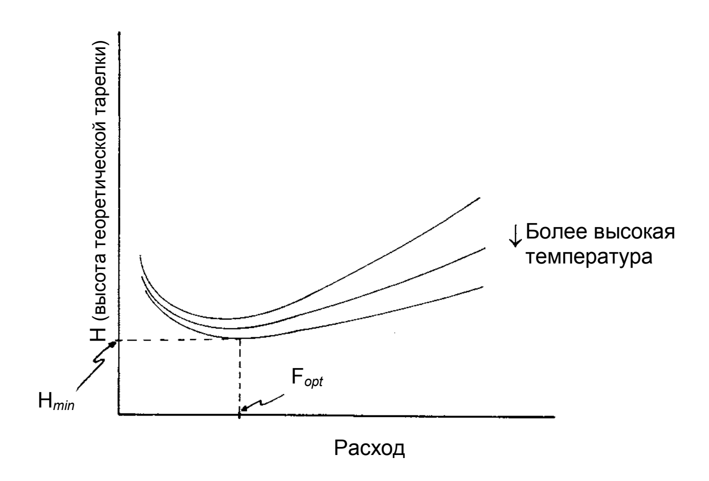


Рис. 2.9. Эффективность колонки, выраженная как зависимость высоты теоретической тарелки от расхода и температуры. За исключением крайне малых расходов (как правило, << 0,1 мл/мин), чем выше поток, тем ниже эффективность колонки. При повышении температуры уменьшается влияние массопереноса, общая эффективность повышается. Расход, при котором значение *H* меньше всего, H_{min}, называется оптимальным для хроматографии, F_{opt}.

как правило, на порядок меньше обычно используемых. При такой скорости повышение эффективности достигается за счёт существенного снижения пропускной способности по количеству проб. Заметим также, что чем выше температура, тем выше интенсивность межфазного переноса, соответственно, тем меньше сказывается влияние массопереноса. Благодаря этому эффективность системы повышается. Хотя это – не единственный фактор (ещё один – меньшая вязкость сорбента), он сильнее всего сказывается на том, что при более высокой температуре, как правило, можно получить пики лучшей формы, в особенности, если анализируемые вещества имеют большую молекулярную массу.

На размытие хроматографической зоны влияют и факторы, не являющиеся собственно хроматографическими. В частности, экспериментатор может повысить эффективность системы, уменьшая до минимума внеколоночный объём. Внеколоночный объём влияет на ширину пика, выраженную через *дисперсию*, σ^2. Соответственно, каждый микролитр дополнительного объёма в системе между инжектором и детектором (даже если не учитывать влияние колонки, описанное выше) отрицательно сказывается на общей эффективности системы. В наиболее точных выражениях внеколоночный объём – это объём инжектора, всех соединительных

трубопроводов и детектора. Математически это выражается в виде суммы всех составляющих объёма (снова в терминах дисперсии или ширины пика):

$$\sigma_t^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{ct_1}^2 + \ldots + \sigma_{ct_x}^2 + \sigma_{det}^2,$$

где t обозначает общий объём, *inj* – инжектор, ct_1 – первый участок соединительного трубопровода, ct_x– последний его участок, *det* – детектор. На рис. 2.10 показаны результаты для трубопроводов, совпадающих по длине, но различающихся по диаметру (то есть систем с разными внеколоночными объёмами). Обратите внимание на то, что в системе с бóльшим внеколоночным объёмом второй и третий пики практически не разрешены до нулевой линии.

2.2.А.4. Параметры пика. Параметры пика используются для количественного описания профиля хроматографического пика. Поскольку на течение хроматографического процесса в ЖХ влияет главным образом диффузия, концентрация в любой точке описывается гауссовой функцией:

$$C = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-1/2(x/\sigma)^2}$$

где C – концентрация в точке x, σ – стандартное отклонение (ширина) пика. Отсюда определяются параметры пика, показанные в таблице 2.1. Подробнее этот вопрос рассмотрен в [4].

Таблица 2.1

Параметры пика с гауссовым распределением

Параметр	Наименование	Обозначение	Формула
Первый, M_0	Площадь пика	A	$\int_{x_1}^{x_2} C\,dt$
Второй, M_1	Время удерживания (центр масс)	t_r	$(1/A)\int_{x_1}^{x_2} C\,dt$
Третий, M_2	Дисперсия	σ^2	$(1/A)\int_{x_1}^{x_2} Ct^2\,dt - t_r^2$
Четвёртый, M_3	Удлинение на срезе (сдвиг по фазе) $M_3/M_2^{2/3}$	A_x или t	$(1/A)\int_{x_1}^{x_2} C(t^2 - t_r^2)\,dt$

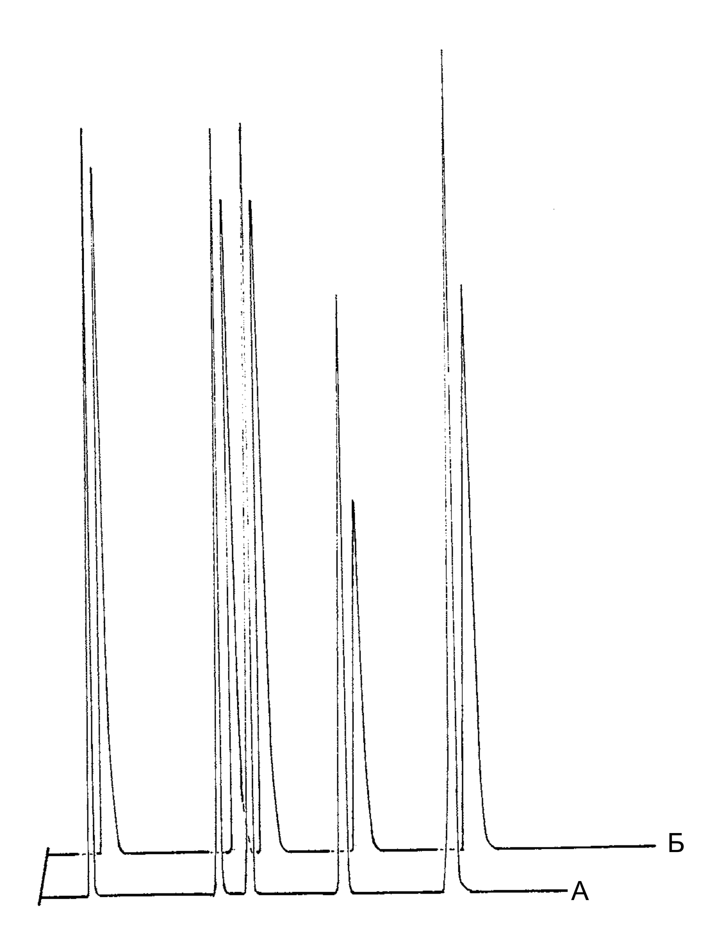


Рис. 2.10. Размытие хроматографических зон во внеколоночном объёме при одних и тех же стандарте и объёме пробы. Рис. (А) соответствует внутреннему диаметру соединительных трубопроводов 0,127 мм (0,005 дюйма), на рис. (Б) – 0,508 мм (0,02 дюйма) (времена удерживания существенно не изменились; хроматограмма (Б) сдвинута вправо для упрощения сравнения). Следует обратить внимание на то, что при диаметре трубопроводов 0,508 мм второй и третий пики почти не разрешены до нулевой линии.

2.3. Обзор приёмов разработки и оптимизации методик

Разработка методики разделения анализируемых веществ – наиболее трудоёмкая часть работы хроматографиста. Для упрощения этого процесса разработаны множество приёмов. Некоторые из них ограничиваются изменением существующих методик, сходных с разрабатываемой. Другие применяются, когда изначально ничего не известно о том, как добиться разделения. Далее рассмотрены наиболее распространённые из таких приёмов.

2.3.A. Элюотропные ряды и сила элюента

Параметры силы элюента* помогают хроматографисту быстро определить относительную силу элюентов. Первым делом были определены элюотропные ряды, каждому элюенту присвоено своё значение ε^0 [5]. Значение ε^0 было рассчитано по среднему времени удерживания, полученному для большого количества растворяемых веществ на конкретном сорбенте.

В таблице 5 в Приложении приведены значения ε^0 для большого количества элюентов на ряде материалов неподвижной фазы. В общем виде зависимость времени удерживания от ε^0 таково, что чем больше ε^0, тем меньше время удерживания данного анализируемого вещества. В терминах хроматографии при сравнении характеристик элюирования двух элюентов говорят, что элюент, применение которого приводит к возрастанию времени удерживания веществ, является более слабым, а тот, который даёт меньшее время удерживания, – более сильным. В частности, если неподвижная фаза представляет собой силикагель, гексан, имеющий малое значение ε^0, является очень слабым элюентом, а метанол, у которого ε^0 велико, – очень сильным. Более конкретно, увеличение ε^0 на 0,05 (т.е. переход на более сильный элюент) приводит к уменьшению k' в 2 – 4 раза. Напротив, уменьшение ε^0 на 0,05 (т.е. переход на более слабый элюент) приводит к увеличению k' в 2 – 4 раза.

Удобнее всего пользоваться ε^0 для прогнозирования примерного состава подвижной фазы, при котором можно получить приемлемые времена удерживания. Следует отметить, что значения ε^0 основаны на процессах адсорбции, соответственно, наибольшая эффективность приходится на участок разделения между жидкой и твёрдой фазами.

---

* *В качестве элюента может быть использован и чистый растворитель. (прим. редактора)*

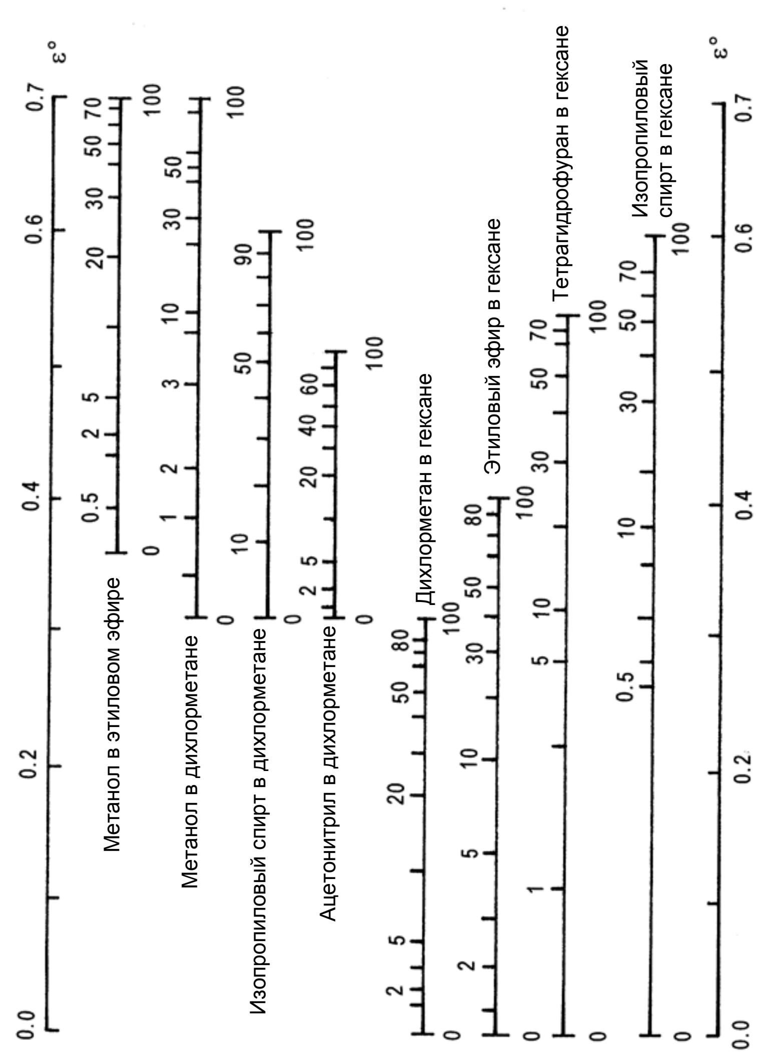


Рис. 2.11. Номограмма для определения составов подвижной фазы с примерно равной элюотропной силой. Порядок применения: соединить прямой линией точки на верхней и нижней шкалах с требуемыми значениями ε^0. В точке пересечения этой прямой со шкалой соответствующей смеси растворителей определить соотношение компонентов этой смеси.

Время удерживания в терминах коэффициента ёмкости k' [$k' \equiv (t_r - t_0)/t_0$, где t_r – время удерживания анализируемого вещества, t_0 – время удерживания несорбируемого компонента] проявляет выраженную логарифмическую зависимость от состава элюента. Значение ε^0 для подвижной фазы смешанного состава зависит также от параметров колонки и разделяемых веществ. Уравнения для прогнозирования примерного состава двухкомпонентной подвижной фазы сложны, а использование их трудоёмко. Для упрощения работы хроматографиста построены многочисленные номограммы (см., например, рис. 2.11). Для пересчёта к значениям ε^0 для оксида алюминия можно воспользоваться приближённой формулой $1{,}3\ \varepsilon^0(SiO_2) \approx \varepsilon^0(Al_2O_3)$ [5]. Чтобы воспользоваться рис. 2.11, соедините прямой линией равные значения ε^0 на верхней и нижней шкалах. В точке пересечения этой прямой со шкалой состава двухкомпонентного элюента будут указаны доли каждого компонента. Если прямые не пересеклись, данная пара компонентов непригодна для требуемого разделения. Например, двухкомпонентные элюенты со значением ε^0 0,55 могут представлять собой смеси изопропилового спирта с гексаном в отношении 55:45, изопропилового спирта с дихлорметаном в соотношении 72:28, метанола с этиловым эфиром в соотношении 14:86.

При пользовании номограммой следует учитывать два момента. Во-первых, не все силикагели идентичны, так что шкалы ε^0 являются приближёнными. Во-вторых, самого по себе показателя ε^0 недостаточно, чтобы сделать вывод о преимуществе одной пары элюентов по отношению к другой, так как он определяется взаимодействием функциональных групп растворителей в элюенте и анализируемого вещества. Назначение номограмм, скорее, в том, чтобы подсказать, какой состав элюента можно принять за отправную точку при разработке или уточнении методики.

Ещё один параметр, на основе которого можно прогнозировать времена удерживания,– это полярность P'. Значения P' для большого числа элюентов также приведены в таблице 5. В отличие от ε^0, значения P' определяются по параметрам равновесного распределения, то есть не относятся к разделению, при котором главным процессом является адсорбция. Параметр P' целесообразно применять в распределительной хроматографии, например, когда используются обращённые фазы (октадецил, октил, фенил и т.п.).

В общем виде соотношение значений k' для заданного анализируемого вещества и двух разных подвижных фаз, 1 и 2, можно описать следующим образом:

$$\log \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{P_2' - P_1'}{2}\ .$$

В первом, довольно грубом, приближении можно считать, что для элюента из двух и более компонентов

$$P' = V_1 P_1 + V_2 P_2 + \ldots + V_n P_n\,,$$

где V_n – объёмная доля n-го компонента P_n.

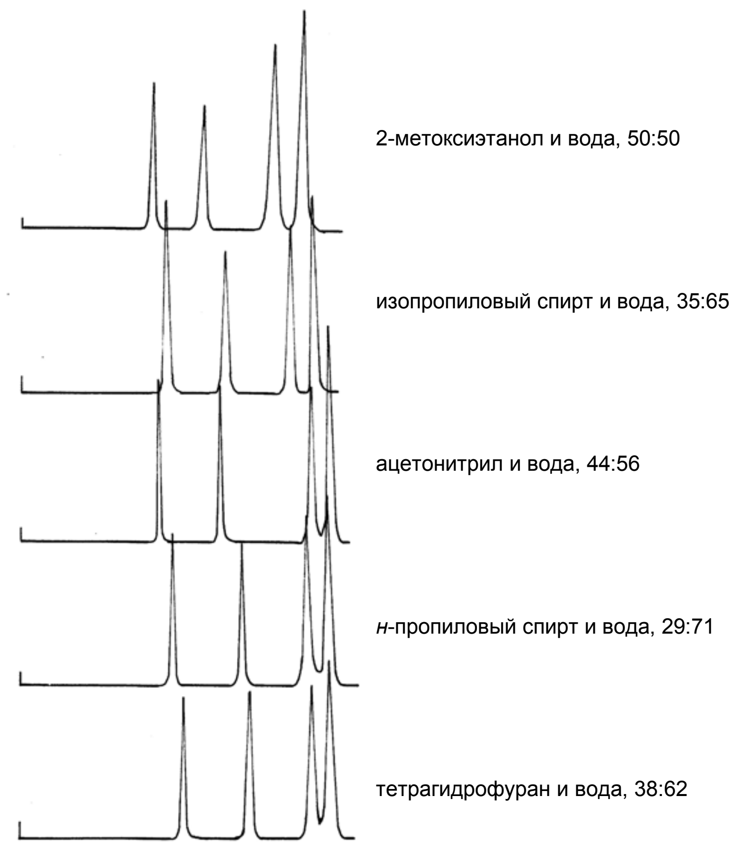


Рис. 2.12. Элюирование четырёх многоядерных ароматических углеводородов на сорбенте C_{18} с подвижными фазами указанных составов (в объёмных долях). Порядок выхода: бензол, нафталин, фенатрен, антрацен.

Применение этих формул даёт исходный состав подвижной фазы для разработки методики. К примеру, чтобы приготовить элюент со значением $P' = 6{,}9$, можно использовать смесь воды с ацетонитрилом в соотношении объёмных долей 25:75

$$P'_{H_2O}V_{H_2O} + P'_{ACN}V_{ACN} = 10{,}2 \times 0{,}25 + 5{,}8 \times 0{,}75 = 6{,}9$$

или смесь воды с изопропиловым спиртом в соотношении 48 : 52

$$P'_{H_2O}V_{H_2O} + P'_{IPA}V_{IPA} = 10{,}2 \times 0{,}48 + 3{,}9 \times 0{,}52 = 6{,}9).$$

Рис. 2.12 иллюстрирует пределы применимости описанного приближённого метода. Здесь через колонку с сорбентом C_{18} пропускали смесь четырёх ароматических углеводородов. Подвижные фазы были составлены так, чтобы получить по возможности близкие хроматограммы. Расчёт значений P' даёт: 7,85 для смеси 2-метоксиэтанола и воды в соотношении объёмных долей 50:50; 8,00 – для смеси изопропилового спирта и воды в соотношении 35:65; 8,26 – для смеси ацетонитрила и воды, 44:56; 8,40 – для смеси *н*-пропилового спирта и воды, 29:71; 7,84 – для смеси тетрагидрофурана и воды, 38:62. Диапазон значений P' – от 7,84 до 8,40 показывает, что использование данного параметра даёт <u>весьма</u> приближённые условия.

2.3.Б. Треугольные диаграммы элюентов

Для разделений с обращённо-фазными сорбентами используют треугольные диаграммы, в которых в вершинах треугольника расположены вода,

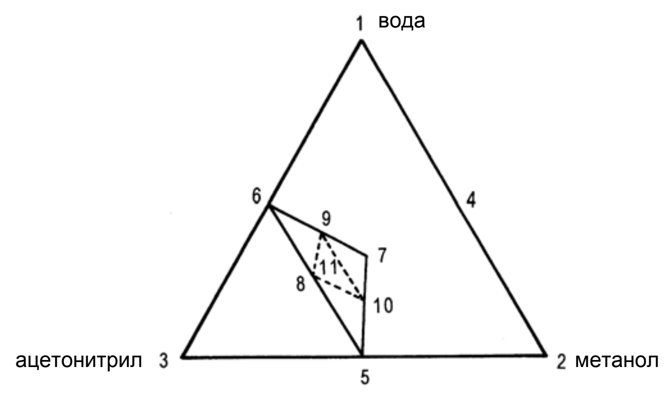


Рис. 2.13. Треугольная диаграмма элюентов для оптимизации условий разделения (описание см. по тексту)

ацетонитрил или тетрагидрофуран и метанол или изопропиловый спирт [7]. Для оптимизации используют результаты, соответствующие точкам от 1 до 7 (рис. 2.13). Три лучших для разделения соотношения, например, точки 5, 6 и 7, становятся вершинами нового треугольника, затем находят ещё четыре результата для точек 8, 9, 10 и 11 (здесь точка 8, например, соответствует соотношению ацетонитрила метанола и воды 42,5:42,5:16,5). Аналогичным образом оптимизируют составы смесей любых трёх элюентов, которые вообще способны смешиваться друг с другом. Если в вершинах первоначального треугольника расположить не чистые растворители, а смеси, количество итераций до окончательной оптимизации можно уменьшить. Например, использование 100 % ацетонитрила, 100 % воды или 100 % метанола редко даёт хорошее разделение, поэтому в одной из вершин можно расположить смесь с соотношением ацетонитрила, метанола и воды 80:10:10 и так далее. Разумеется, полезно что-то знать заранее о требуемом хроматографическом разделении. Для ускорения оптимизации можно использовать компьютерные алгоритмы, для расчёта четырёхкомпонентных смесей элюентов применять диаграмму в виде тетраэдра. Во всех случаях эти приёмы позволяют найти соотношение компонентов смеси элюентов, дающее в изократическом режиме оптимальное разделение всех пиков. Поскольку метод оптимизации ничего не говорит о ёмкости колонки (т.е. наибольшем количестве пиков, которые могут быть разделены на минимально приемлемом уровне в заданное время), приемлемость разрешения до нулевой линии не гарантируется. Соответственно, приемлемое с точки зрения хроматографиста разделение может оказаться возможным только в градиентном режиме.

2.3.B. Оконные диаграммы

Для слабых органических кислот Деминг предложил использовать *оконные диаграммы* [8]. Для каждой пары элюентов строится зависимость соотношения времён удерживания от водородного показателя элюента pH. На рис. 2.14 показана оконная диаграмма для четырёх анализируемых веществ. Обратите внимание на то, что построены шесть зависимостей разрешения от pH для шести сочетаний анализируемых веществ. Линия, пересекающая ось R_s в самой высокой точке, показывает, при каком pH достигается оптимальное разрешение. Окна под кривыми дают локальные оптимумы разрешения для всех пар анализируемых веществ. Данный способ оптимизации особенно хорош для систем с множеством анализируемых веществ, поскольку для построения графиков используются результаты, полученные в опыте.

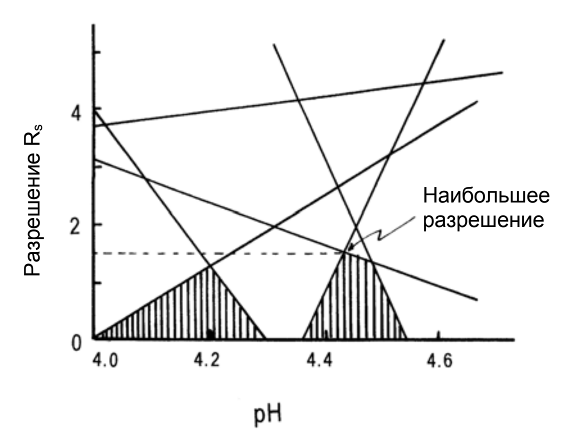


Рис. 2.14. Оконная диаграмма для четырёх анализируемых веществ при разных значениях pH. Наибольшее разрешение составляет около 1,5 при pH = 4,2.

Для окончательной оптимизации условий хроматографического опыта нужно также принимать во внимание разумные пределы времен удерживания и других параметров.

2.3.Г. Пробные градиенты

Описанные выше приёмы основаны на системном подходе к разработке методики разделения. При этом в предположении изократического режима изменяют одну переменную (или несколько взаимосвязанных переменных) и исследуют результаты. Такие приёмы весьма эффективны, если известно, из каких веществ состоит проба и понятно, какие параметры разделения наиболее важны.

В случаях, когда неизвестно даже количество переменных, применять изократический подход рискованно. Во-первых, трудно сказать, будут ли элюированы все пики. Некоторые вещества удерживаются столь сильно, что соответствующие пики сливаются с нулевой линией (если изократические условия предпочтительны, следует начинать с самого сильного элюента. В этом случае можно найти время удерживания последнего пика. Затем можно уменьшать силу подвижной фазы, насколько это позволяет расчёт по треугольной диаграмме).

Если предполагается градиентный режим, можно провести опыт с максимальным градиентом от 0 до 100 и получить хроматограмму. Из неё можно оценить силу элюента, необходимую для элюирования каждого из компо-

нентов анализируемой смеси, а затем сделать попытку работать с меньшим градиентом или даже в изократическом режиме.

2.4. Линейность, чувствительность, предел обнаружения, отношение сигнал-шум и пригодность системы

Большинство методик количественного анализа предполагает построение калибровочной кривой по набору стандартов с известными концентра-

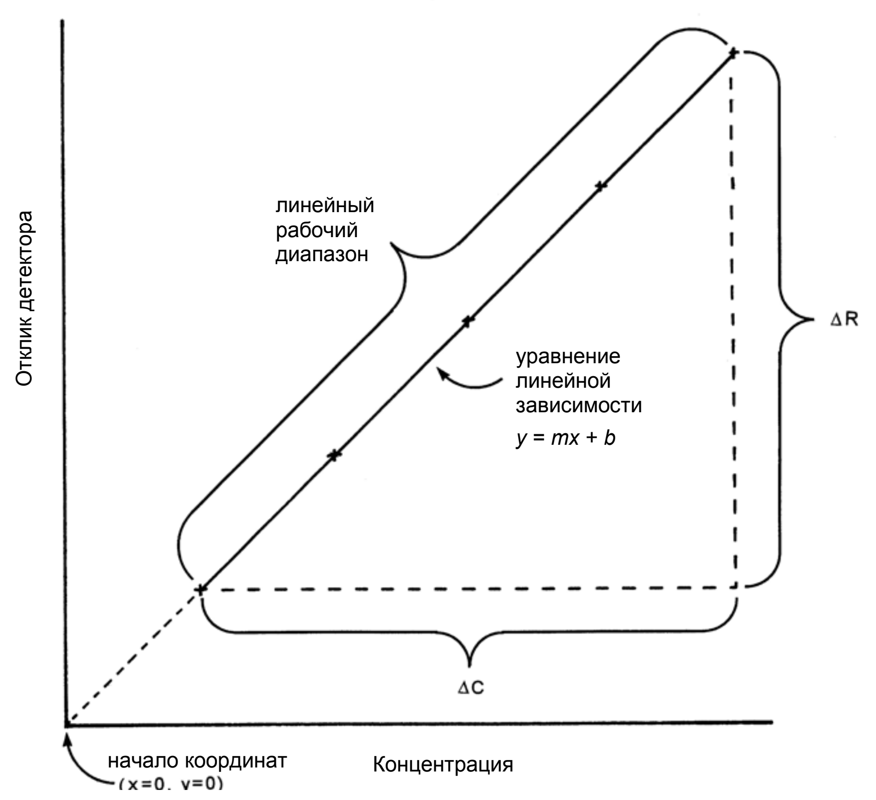


Рис. 2.15. График зависимости отклика детектора от концентрации. Стандарты с самой высокой и самой низкой концентрациями анализируемого вещества (отмечены «+») определяют линейный рабочий диапазон. Линейная зависимость описывается уравнением $y = mx + b$, где y – отклик для данной концентрации x, m – коэффициент наклона (соответствует чувствительности и коэффициенту отклика R_f), b – точка пересечения с осью y. Если калибровочная кривая проходит через начало координат, $b = 0$.

циями анализируемых веществ. В самом общем виде *калибровочная кривая* – это график зависимости отклика детектора R от концентрации анализируемого вещества в растворе стандартного образца. Такой график показан на рис. 2.15. Наименьшая и наибольшая концентрация, при которых могут быть получены статистически приемлемые результаты анализа, определяют *рабочий диапазон концентраций*. В идеале калибровочная кривая обладает следующими свойствами: (1) она линейна во всём диапазоне концентраций; (2) её продолжение проходит через начало координат (то есть нулевой концентрации соответствует нулевой отклик); (3) её наклон не слишком крут (так что рабочий диапазон концентраций не слишком узок), но и не слишком полóг (так что отклик заметно меняется при изменении концентрации).

2.4.А. Линейность

Линейность калибровочной кривой показывает, насколько коррелирует набор точек в координатах отклик – концентрация в пределах рабочего диапазона. Точки с самой малой и самой большой концентрациями определяют рабочий диапазон методики. Калибровочная кривая описывается обычным уравнением линейной зависимости: $y = mx + b$, где y – отклик детектора, m – коэффициент наклона (соответствует чувствительности $\Delta R/\Delta C$), b – значение y, при котором $x = 0$, т.е. точка пересечения с осью y (см. рис. 2.15). Степень корреляции калибровочной кривой с линейной зависимостью описывают с помощью коэффициента корреляции r^2. Для важных аналитически опытов значение r^2 должно быть не менее 0,995. Для менее важных случаев может быть приемлемым значение r^2 0,990 и даже меньше.

Иногда калибровочная кривая может оказаться существенно нелинейной. Обычно так бывает при работе со спектрофотометрическими детекторами в области очень больших и очень малых концентраций анализируемых веществ, когда имеет место отклонение от закона Бэра. Флуориметрические детекторы дают нелинейный отклик в области высоких концентраций вследствие так называемого самопоглощения: молекулы анализируемого вещества между флуоресцирующей молекулой и приёмником детектора поглощают излучение, из-за этого регистрируется меньшая интенсивность флуоресцентного излучения.

Если калибровочная кривая является нелинейной, и добиться линейности подбором условия анализа не удаётся, используют нелинейную аппроксимацию. На рис. 2.16 показаны кусочно-линейное и криволинейное приближения зависимости отклика от концентрации полученные опытным путём.

Обычно системы обработки данных включают средства аппроксимации, однако нелишне понимать, как они действуют. Кусочно-линейная аппроксимация состоит в соединении соседних точек отрезками прямых. Концентрацию в аналитическом опыте находят по соответствующим значениям отклика на этих отрезках.

В более сложных случаях набор точек калибровочной кривой может лечь на график квадратного трёхчлена или многочлена более высокого порядка, иначе говоря, зависимость отклика от концентрации описывается более сложным, чем линейной, уравнением.

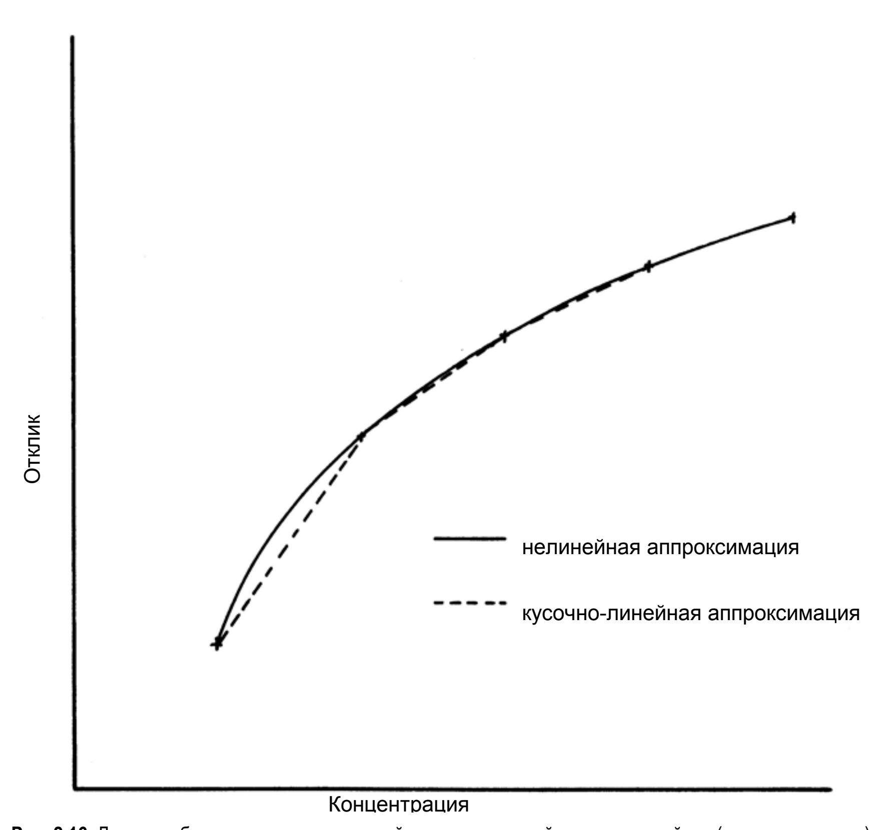


Рис. 2.16. Два способа аппроксимации нелинейных зависимостей: кусочно-линейная (штриховая линия) и нелинейная (сплошная линия). Кусочно-линейная аппроксимация выполняется быстро и не требует или почти не требует специализированного программного обеспечения. Чем больше кривизна (как на участке малых концентраций), тем больше отклоняется кусочно-линейная аппроксимация от фактических значений.

2.4.Б. Чувствительность

Чувствительность методики определяется как коэффициент наклона калибровочной кривой. Как показано на рис. 2.15, его значение равно $\Delta R/\Delta C$. Большей чувствительности соответствует более крутой наклон калибровочной кривой, иначе говоря, отклик меняется сильнее при том же изменении концентрации. При меньшей чувствительности наклон калибровочной кривой меньше. Поскольку предел значений отклика детектора данного типа изменить нельзя, рабочий диапазон обратно пропорционален чувствительности методики. *Не следует путать чувствительность с пределом обнаружения методики*.

Почему чувствительности анализа придаётся такое большое значение? Если чувствительность излишне высока, диапазон концентраций, в котором можно вести анализ, будет очень узким. Чтобы попасть в этот диапазон, нужно очень тщательно готовить и разводить пробы. Если же чувствительность излишне низка, методика не позволит распознать близкие концентрации анализируемых веществ (рис. 2.17). Чувствительность должна быть на среднем уровне, чтобы обеспечить как возможно более широкий рабочий диапазон, так и хорошее определение близких значений концентрации.

2.4.В. Предел обнаружения

Предел обнаружения зависит от условий анализа и природы определяемых веществ и подчас кажется окутанным тайной. Дело в том, что для определения предела обнаружения нужно найти множество параметров. По определению, предел обнаружения – это точка, в которой сигнал от анализируемого вещества становится неотличимым от шума в системе. Однако с практической точки зрения можно рассматривать это понятие двояко. С одной стороны, предел обнаружения определяется методикой, с другой – приборной частью хроматографической установки. Прежде, чем перейти к дальнейшему обсуждению, следует ввести ещё один параметр, влияющий на предел обнаружения, а именно, отношение сигнал-шум.

2.4.Г. Отношение сигнал-шум

Отношение сигнал шум связано с определением отклика как того, во сколько раз сигнал от анализируемого вещества должен превосходить по уровню шум, чтобы считаться истинным сигналом. Рис. 2.18 представляет в увеличенном виде нулевую линию и иллюстрирует понятие уровня шума. При изократических условиях шум системы обычно определяют, записывая

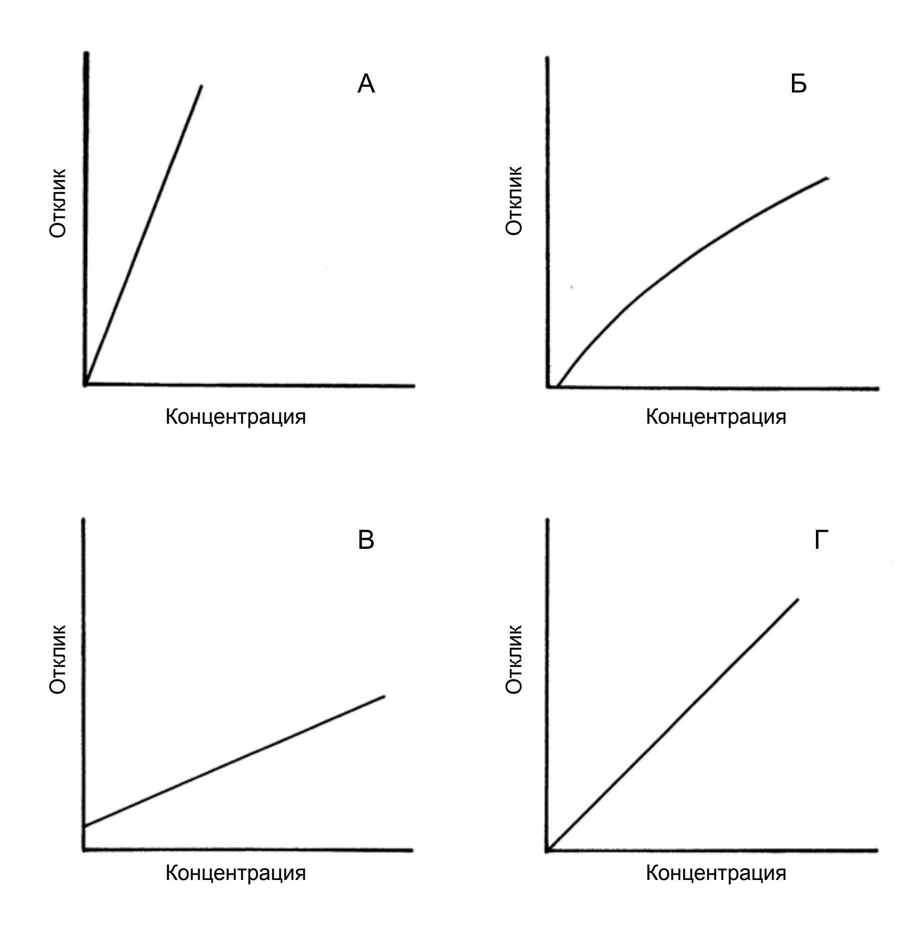


Рис. 2.17. Типичные калибровочные кривые. (А) Слишком высокая чувствительность (значение $\Delta R/\Delta C$ слишком велико) – рабочий диапазон слишком мал. (Б) Нелинейная, пересечение с осью *y* не в нуле (можно использовать нелинейную аппроксимацию, но нужны специальные программы). (В) Слишком низкая чувствительность (значение $\Delta R/\Delta C$ слишком мало), пересечение с осью *y* не в нуле. (Г) Идеальная калибровочная кривая: хорошая чувствительность, пересечение с осью *y* почти в нуле.

сигнал в холостом опыте в течение 1 – 2 часов. Наибольший размах сигнала в этом промежутке времени и считается шумом системы.

В градиентном опыте шум определяют аналогично, однако опыт должен иметь довольно большую продолжительность, при этом нужно следить за

постоянством уровня шума. Скачкообразное изменение отклика из-за изменения состава подвижной фазы шумом не считается.

Теперь можно определить предел обнаружения. Если выбрать наименьшее отношение сигнал-шум равным 5:1 (записывается $S/N = 5$), то сигнал, уровень которого меньше, не принимается в расчёт. Чем выше отношение сигнал-шум, тем выше точность и сходимость анализа. Принять меньшее отношение сигнал-шум означает поступиться точностью и сходимостью ради возможности обнаруживать как можно меньшие концентрации анализируемых веществ. Выбор определяется задачами, стоящими перед аналитиком.

Теперь можно выяснить, какая разница между двумя вышеупомянутыми типами предела обнаружения. *Приборный* предел обнаружения (иначе просто «предел обнаружения», обозначается *LOD*) рассчитывается при низком отношении сигнал-шум. Здесь всё, что необходимо, – отличить наличие определяемого вещества от его отсутствия. Обратите внимание, что при $S/N = 2$ пик любого анализируемого вещества может на 50 % состоять из шума. Невзирая на это, именно предел обнаружения обычно рекламируют продавцы аппаратуры. Поэтому нужно обязательно узнать,

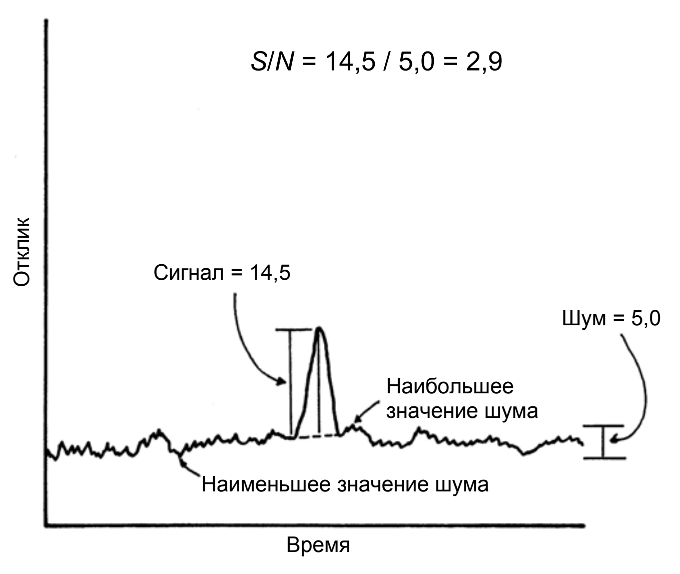


Рис. 2.18. Расчёт отношения сигнал/шум. Обычно это делают в разных экспериментах: сначала длительно вхолостую регистрируют нулевую линию, затем проводят опыт с введением пробы. На рисунке для упрощения показаны как пик анализируемого вещества, так и размах шума (от наименьшего до наибольшего значения).

какое отношение сигнал-шум выбрал изготовитель, какие вещества и при каких условиях опыта он анализировал, чтобы точно оценить достоинства и недостатки аппаратуры.

Предел обнаружения *методики* (также называемый «предел количественного определения», обозначается *LOQ*) выбирают такое отношение сигнал-шум, чтобы не просто различить наличие и отсутствие определяемого вещества, а получить осмысленный и повторяемый количественный результат. Соответственно, предел обнаружения методики, как правило, определяют при отношениях сигнал-шум от 5 до 10. Итак, *LOD* и *LOQ* обычно существенно различны.

2.4.Д. Коэффициент отклика

Коэффициент отклика используется в методиках как с внешним, так и с внутренним стандартом. В методике с *внешним стандартом* калибровочную кривую строят с помощью образцов, диапазон концентраций анализируемого вещества в которых перекрывает предполагаемый интересующий диапазон. Обычно кривую строят по пяти точкам. После валидации методики можно уменьшить количество точек от внешнего стандарта и определять коэффициент отклика R_f по наклону кривой или даже по одной точке (обычно средней, соответствующей предполагаемой концентрации анализируемого вещества). В обоих случаях – при определении коэффициента отклика как по наклону, так и по точке, R_f выражается в единицах отношения отклика к концентрации, т.е. (единица поглощения) / (М/л). Если калибровочная кривая линейна, R_f – её коэффициент наклона. Отклик детектора при выходе анализируемого вещества, делённый на коэффициент отклика, даёт концентрацию этого вещества в пробе (без учёта массы пробы, коэффициента разведения и пр.).

Если используется *внутренний стандарт*, до начала анализа в пробу вводят известное количество соединения, химически подобного определяемому веществу, но разделенного с ним хроматографически и не являющегося частью матрицы пробы. При этом предполагается, что благодаря химическому подобию внутреннего стандарта определяемому веществу они будут вести себя в процессе анализа сходным образом. Внутренний стандарт используется для контроля потерь анализируемого вещества при преданалитической обработке пробы и компенсации небольших отклонений в работе хроматографа. Впрочем, последнее не столь важно, как это было ранее, поскольку в последнее время метрологические характеристики аппаратуры значительно повысились. Тем не менее, внутренние стандарты и суррогаты (т.е. вещества, отличные от анализируемых, вводимые в пробу

до анализа) по-прежнему играют важную роль, если имеет место значительная обработка пробы до ввода в хроматограф. Дело в том, что иначе проконтролировать потери анализируемых веществ в процессе пробоподготовки становится невозможно.

При использовании внутренних стандартов необходимо убедиться в линейности отклика детектора на внутренний стандарт. Коэффициент отклика рассчитывают по отношению площади пика анализируемого вещества (A_u) к площади пика внутреннего стандарта (A_{is}) и концентрации внутреннего стандарта (C_{is}) в калибровочной пробе:

$$R_f = \frac{A_u / A_{is}}{C_{is}} .$$

Затем находят концентрацию определяемого вещества в пробе как отношение площади пика этого вещества A_u к площади пика внутреннего стандарта A_{is} и коэффициенту отклика R_f:

$$C_u = \frac{A_u / A_{is}}{R_f} .$$

2.4.E. Разработка методики

Методику разрабатывают не на пустом месте. В ходе разработки учитывают множество соображений. Некоторые из них – практического толка, как, например, использование имеющейся аппаратуры, применение наименее опасных и вредных химических реактивов и процессов, ограничение потребления расходных материалов. Другие – это соображения, связанные с физической и химической природой пробы и анализируемых веществ. Сюда относятся состояние матрицы пробы, содержащей определяемое вещество (твёрдое, жидкое, газообразное), структура, устойчивость и химическая активность этого вещества. Важно также учитывать его количество и то свойство, по которому производится детектирование (поглощение излучения, заряд, флуоресценция, показатель преломления). Необходимо продумать вопросы, связанные с растворимостью аналита, а также чувствительность к изменению pH, температуры, содержания кислорода и световому излучению.

Продумав всё это, надлежит перейти к функциональным вопросам, к примеру, точности и правильности методики, уровня сложности манипуляций с пробой, времени, необходимого для пробоподготовки и анализа (иначе говоря, производительности хроматографа), простоты переноса

методики на другие приборы, освоения её другими хроматографистами и и другими лабораториями.

Указанные соображения определяют некий набор основных требований. Экспериментатор варьирует рабочие параметры (состав подвижной фазы, растворитель пробы, размеры колонки и состав набивки), пока не будут удовлетворены все критерии. Этот процесс, называемый *оптимизацией*, продолжается до тех пор, пока все требования не будут выполнены. После этого считается, что все переменные однозначно определены, разработка новой методики закончена.

2.4.Ж. Валидация и документирование методики

Методика описывается в документе, содержащем все существенные её элементы. Цель этого документа в том, чтобы дать возможность специалисту воспроизвести методику и получить результаты, не отличающиеся статистически от результатов, которые любой другой аналитик может получить, используя ту же методику.

Итак, документ, описывающий методику, содержит:

1. Обобщённое описание пробоподготовки (разведение, экстрагирование, смена растворителя и т.д.).
2. Общие требования к хроматографической системе (тип колонки, примерный состав подвижной фазы, тип и установки детектора, использование внешних или внутренних стандартов и т.д.).
3. Перечень ошибок, которых следует избегать.

Обратите внимание на то, что данный документ *не содержит* подробного описания методики. Подробности уточняются в каждой лаборатории независимо. По существу, описание методики даёт лаборатории основу для разработки документа, описывающего во всех деталях, как именно в этой лаборатории проводится анализ.

Исходя из общего описания анализа, весь его процесс описывают, уточняют и оптимизируют. Разрабатывают предварительную методику, на основании которой несколько аналитиков или лабораторий проводят анализ. Процесс, позволяющий убедиться в том, что во всех лабораториях все аналитики воспроизводят одни и те же результаты, используя данную методику, называется *валидацией методики*. Методика не может считаться прошедшей валидацию, пока ряд аналитиков в ряде лабораторий не проанализируют *один и тот же набор* проб, используя протокол, описанный в методике, и не получат статистически эквивалентные результаты [9]. Статистическая обработка результатов помогает выработать минимально

необходимые критерии, касающиеся точности и сходимости анализа. Если эти критерии удовлетворяются, порядок работы подробно описывают в виде документа, который называется «*Стандартная Операционная Процедура*» (СОП).

2.4.И. Документация по описанию стандартной операционной процедуры (СОП)

В документации по СОП описывается во всех подробностях, как в точности в лаборатории работают с каждой отдельной пробой. Уровень детализации описания – самый высокий. Приводятся все количественные показатели – объёмы мерных колб, коэффициенты разведения, объёмы вводимых в хроматограф проб. Описываются все использованные при анализа компоненты – тип колонки, качество растворителя, типы фильтров, стандарты, требования к их чистоте. Протоколируются все условия работы – расход, установки детектора, температура установки. По существу, данный документ детализирован настолько, что на его основе квалифицированный хроматографист может в точности воспроизвести опыт, а ревизор – проследить за пробоподготовкой и анализом. Никакие отклонения от СОП не допускаются.

2.4.К. Пригодность хроматографической системы

Помимо подробного описания порядка применения методики, нужно каким-то образом гарантировать, что аппаратура работает в допустимых пределах рабочих параметров. Указанные параметры, на основании которых делается вывод о пригодности или непригодности анализа, разделяются на два класса: касающиеся отдельных пиков и касающиеся соотношений между пиками. Для отдельных пиков такими параметрами являются коэффициент асимметрии, число теоретических тарелок, площадь или высота пика, а также относительное стандартное отклонение для повторных вводов пробы. Для нескольких пиков используют разрешение (R_s или α). Значения указанных параметров определяют в каждом опыте в процессе валидации методики, а впоследствии постоянно контролируют и протоколируют.

Площадь и асимметрия пиков могут быть ограничены сверху и снизу, а число теоретических тарелок и разрешение – только снизу. Когда сформулированы требования к параметрам, их значения должны периодически контролироваться. Для этого можно, например, наносить их на графики, как описано в разделе 3.12. Значения, выходящие за предельно

допустимые, свидетельствуют о неисправности или ошибке в работе. Преимуществом графического отображения является возможность заблаговременно заметить тенденцию в изменении того или иного параметра аппаратуры, поскольку именно тенденция зачастую говорит о том, что вскоре произойдёт нарушение работы.

Количество контролируемых параметров и ширина диапазона их допустимых значений зачастую связано с тем, насколько велика ответственность за результаты анализа этого вещества. Например, при анализе бытовых чистящих средств допустим куда больший разброс рабочих параметров, чем при анализе сильнодействующих веществ в лекарственных препаратах. Если все критерии удовлетворяются, и хроматограф работает надлежащим образом, данные, полученные при анализе образца, будут обладать высокой достоверностью. Если же параметры прибора выходят за допустимые пределы, вступают в силу положения Главы 3.

Прежде, чем отчитываться о результатах анализа, необходимо убедиться в том, что допустимые пределы изменения всех параметров документированы, и в процессе работы действительные параметры системы не выходят за эти пределы. Если все параметры в процессе анализа находятся в заданных пределах, это говорит о том, что установка пребывает *в управляемом состоянии*, а полученные на ней результаты высоконадёжны. Если же параметры хроматографической системы не отвечают требованиям пригодности, то есть одна или несколько переменных выпадают за допустимые пределы, систему следует считать *неуправляемой*. В этом случае необходимо найти и устранить неисправность или ошибку в работе оператора.

2.4.Л. Устойчивость и выносливость методики

Как сказано выше, идеальную методику отличает полное отсутствие или незначительность разброса результатов независимо от типа аппаратуры, квалификации оператора (если его квалификация отвечает минимальным требованиям), а также небольших различий в параметрах системы и матрицы пробы от лаборатории к лаборатории. Методика обладает *выносливостью (ruggedness of the method)*, если она даёт воспроизводимые результаты (в терминах относительного стандартного отклонения, *RSD*, в процентах). Это означает, что на методика нечувствительна к смене реактивов, операторов и аппаратуры. Зачастую выносливость является необходимым условием валидации методики, поскольку при разработке важнейших методик фирмы проводят межлабораторные валидационные испытания.

В более широких масштабах объединения фирм-изготовителей, желающие пользоваться одними и теми же приёмами анализа, также проводят совместные круговые исследования.

Под *устойчивостью или робастностью (robustness)* понимают свойство методики давать приемлемые результаты при умышленном изменении её параметров. К таким параметрам относятся состав подвижной фазы, pH раствора и температура. Устойчивость методики обычно изучают только на начальных этапах процесса валидации. При этом выясняют, какие из параметров наиболее важны, и что следует предпринять, чтобы не допустить их изменения.

2.5. Обзор вариантов хроматографического разделения

Количество вариантов реализации высокоэффективной жидкостной хроматографии выросло столь значительно, что их уже целесообразно разделить на несколько категорий. В большинстве случаев для разделения используются фундаментальные физические и химические различия классов соединений. К таким различиям относятся заряд, конформация, размеры молекул, растворимость, устойчивость, трёхмерная структура. Сорбенты подвергают модификации, чтобы добиться наибольшего различия в силе удерживания, обусловленной физическими и химическими свойствами.

В данном разделе даны основные положения, относящиеся к разным типам разделения, описано, как и когда они используются, указаны классы разделяемых веществ. В таблице 2.2 дан перечень категорий, которые будут рассмотрены ниже в разделе.

2.5.A. Нормально-фазная хроматография

По определению, нормальными называются полярные неподвижные фазы или материалы набивки. Существуют три типа нормальных фаз: немодифицированные, модифицированные с нанесёнными веществами и привитые.

Немодифицированные сорбенты относятся к категории жидкостно-твердотельной хроматографии (ЖТХ). Классические нормальные фазы использовались в ЖХ изначально: это окись алюминия (Al_2O_3) и окись кремния (SiO_2). Для разделения используют существенно неполярные подвижные фазы (например, пентан, гексан, гептан, изооктан) с малыми добавками (как правило, от 0,1 до 10 %) более полярных веществ (эфиров, ацетатов,

Таблица 2.2
Классификация ЖХ по типам разделения

Наименование	Характер разделяемых веществ	Характер взаимодействия между анализируемыми веществами и поверхностью сорбента в колонке
Нормально-фазная (немодифицированная поверхность)	Низкополярные, изомеры	Адсорбция на основе диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Нормально-фазная (привитофазные сорбенты)	Широкий диапазон молекулярных масс – от малых до средних; любая полярность	Распределение и адсорбция на основе диполь-дипольного взаимодействия и взаимодействия веществ с различной поляризуемостью
Обращённо-фазная (привитофазные сорбенты)	Широкий диапазон молекулярных масс – от малых до средних; любая полярность	Распределение и адсорбция на основе гидрофобного взаимодействия
Ион-парная	Заряженные или высокополярные	Распределение и адсорбция на основе электростатического и гидрофобного взаимодействия между парами ионов
Ионнообменная	Имеющие постоянный заряд	Ионное равновесие на основе только плотности заряда
Аффинная	Подложка и ферменты	Распознавание молекул на основе специфических трёхмерных многоточечных процессов связывания, например, диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Хиральная	Энантиоморфные соединения	Распределение и адсорбция на основе неспецифического трёхмерного взаимодействия, например, диполь-дипольного взаимодействия и образования водородных связей
Эксклюзионная	Олигомеры и полимеры	Разделение по размеру на основе различия размеров пор сорбента

хлорированных алканов, спиртов). В последнее время в качестве нормально-фазных адсорбентов стали применяться также графитированный углерод, окись циркония (ZrO_2) и гидроксилапатит [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$].

Удерживание на немодифицированной подложке обусловлено исключительно адсорбцией и десорбцией анализируемых веществ поверхностью сорбента. В этом процессе анализируемое вещество замещает компоненты подвижной фазы, адсорбированные поверхностью. Энергетика процесса и положительное взаимодействие анализируемого вещества с поверхностью и определяют его удерживание.

К модифицированным относятся, в первую очередь, материалы, в которых непосредственно на поверхность основы нанесены определенные органические или неорганические вещества. К примерам такого рода относятся ионы серебра (неорганический модификатор) и гликоли (органические модификаторы). Нанесённые материалы придают сорбенту иные свойства для взаимодействия с разделяемыми молекулами. Например, промышленность выпускает колонки с силикагелем, пропитанным соединениями серебра. Такие колонки используются для разделения соединений, различающихся по степени ненасыщенности. Механизмом удерживания и здесь остаётся адсорбция. Колонки с органическим модификатором существенно отличаются тем, что их готовят, как правило, в лаборатории. Здесь удерживание обеспечивается распределением анализируемых веществ между двумя жидкостями.

Нормально-фазные привитофазные сорбенты весьма разнообразны – от цианопропила до диола и многочисленных хиральных колонок. В таких колонках в качестве основы почти всегда используется силикагель, однако в последнее время промышленность освоила выпуск оксида алюминия и оксида циркония с полимерным покрытием. В привитофазных сорбентах удерживание обеспечивается адсборционно-распределительным механизмом между подвижной фазой (содержащей анализируемое вещество) и привитой фазой. Селективность анализа определяется, в основном, свойствами неподвижной фазы, но правильный подбор элюента может значительно повысить селективность.

2.5.А.1. Немодифицированные нормально-фазные адсорбенты. Немодифицированные нормально-фазные адсорбенты эффективны при разделении изомеров и ингредиентов, экстрагированных из природных животных и растительных жиров. Весьма важно, что число веществ, растворимых в низкополярных подвижных фазах, ограничено, а сам процесс разделения крайне чувствителен даже к незначительным изменениям состава подвиж-

ной фазы. Именно эти два недостатка и сдерживают применение немодифицированных нормально-фазных сорбентов.

2.5.А.2. Оксид алюминия (Al_2O_3). С точки зрения хроматографии, оксид алюминия отличается от силикагеля (диоксида кремния) двумя важными показателями: устойчивостью к изменениям pH и возможностями химической модификации. Главное преимущество оксида алюминия по сравнению с силикагелем состоит в устойчивости в широком диапазоне pH. Устойчивость силикагеля резко падает в растворах с pH свыше 7 или менее 2, тогда как оксид алюминия большей частью сохраняет устойчивость при pH от 0 до 14. Зная об этом, не следует, однако, забывать о проверке других компонентов системы для ВЭЖХ на совместимость с агрессивными подвижными фазами.

Главным недостатком оксида алюминия является то, что большинство вариантов модификаций его поверхности, желательных для хроматографии, полученных непосредственно химическим путём, являются нестабильными. Поэтому единственный путь модификации сорбентов на основе оксида алюминия – покрыть его поверхность реакционноспособными мономерами, а затем осуществить их сшивку и получить полимерный материал основы. Напротив, силикагель модифицировать химически можно очень легко и с хорошей воспроизводимостью, обеспечивая при этом стабильность полученного материала (например, с октадецилом).

Хотя оксид алюминия используется в хроматографии значительно реже, чем силикагель, он по-прежнему находит применение там, где в процессе разделения требуется очень высокий или очень низкий водородный показатель элюента. К тому же, в зависимости от способа подготовки, сам оксид алюминия может быть кислым, нейтральным или основным. Это определяется при измерении pH 10 %-ной водной суспензии оксида алюминия. Суспензии кислого оксида алюминия имеют pH около 3. Такие оксиды алюминия действуют как анионнообменные сорбенты. Суспензии основного оксида алюминия имеют pH около 9,5. Такие оксиды алюминия действуют как катионнообменные сорбенты. Суспензии нейтрального оксида алюминия имеют pH около 6,5 и чаще всего используются в ВЭЖХ.

Ещё одно ограничение на применение сорбентов на основе оксида алюминия налагает то, что диапазон диаметров пор весьма ограничен – чаще всего от 60 до 100 Å. Следовательно, в отличие от силикагелевых сорбентов, широкий диапазон площадей поверхности для сорбентов на основе оксида алюминия недоступен.

2.5.А.3. Силикагель (SiO_2). Силикагель применяется в ВЭЖХ в качестве сорбента чаще всего. Однако его использование в немодифицированном

виде пренебрежимо мало, по сравнению с применением в разнообразных производных формах. С точки зрения хроматографии, силикагелю присущи как достоинства, так и недостатки. К его преимуществам для ВЭЖХ относятся следующие:

1. Силикагель с диаметром зёрен от 1,5 мкм до 10 мкм можно получить легко и с высокой воспроизводимостью; такие силикагели выпускаются серийно.
2. Силикагель с диаметром пор от нуля (непористый) до 4000 Å также можно получить легко и с высокой воспроизводимостью; такие силикагели выпускает промышленность (диаметр пор радикально сказывается на удельной поверхности носителя – см. табл. 2.3).
3. Силикагель можно легко и с высокой воспроизводимостью модифицировать химически, получая материалы от высокополярных до неполярных и от неспецифических до высокоспецифических.
4. Большинство силикагелей класса «для ВЭЖХ» выдерживают рабочее давление до 27,6 МПа (4000 *фс/дюйм*^{2}).
5. Силикагель устойчив к широкому спектру органических растворителей.

Таблица 2.3

Примерное соотношение размера пор и удельной поверхности силикагеля

Размер пор, Å	Удельная поверхность, м^2/г
30	> 650
60	500
100	250
120	200
300	100
500	50
1000	20
3000	10
4000	5

К недостаткам относятся следующие свойства силикагеля:

1. Силикагель даже после химической модификации имеет на поверхности участки (силанольные группы), сильно взаимодействующие с молекулами, способными образовывать водородные связи

(например, первичными аминами), что приводит к искажению формы хроматографических пиков (удлинению срезов), а в некоторых случаях – к необратимой адсорбции.

2. Поверхностные силанольные группы неоднородны, что приводит к искажению формы пиков – удлинению срезов.
3. Силикагель растворяется в жидкостях с pH менее 2 и более 7.
4. Немодифицированный силикагель быстро деактивируется (теряет способность к сорбции), если в элюенте имеется вода.

Поскольку достоинства силикагеля значительно «перевешивают» его недостатки, примерно 75 % сорбентов для ВЭЖХ выполнены именно на силикагелевой основе.

2.5.А.3.А. Химия поверхности силикагеля. На поверхности силикагеля имеются шесть различных химических групп (рис. 2.19). Первая, имеющая *силоксановую связь*, Si–O–Si, определяет структуру внутреннего «скелета» силикагеля. Вторя, кремниевая группа с гидроксильным окончанием, наиболее распространена на поверхности. Она называется *силанольной*.

Рис. 2.19. Функциональные группы на поверхности силикагеля: (А) – силоксановая связь; (Б) – силанольная группа; (В) – геминальная силанольная группа; (Г) – вицинальная силанольные группы; (Д) – силанольная группа, модифицированная металлом; (Е) – включённый ион металла.

Силанольные группы следующего типа имеют две оконечные гидроксильные группы на одном атоме кремния и называются *парными или геминальными силанольными группами*. Далее, между двумя близлежащих силанольных группах может иметься водородная связь. В таком случае связанные силанольные группы называют *соседними или вицинальными*.

Дальнейшее рассмотрение осложняется тем, что матрица силикагеля не представляет собой чистый диоксид кремния, а содержит примеси в виде ионов металлов – двух- и трёхвалентного железа и трёхвалентного хрома. Если ионы металла расположены поблизости от поверхностных силанольных групп, они резко меняют кислотно-основный характер этих групп. В этом случае говоря о *силанольных группах, модифицированных металлом*. Наконец, шестая группа отличается тем, что ионы металла включены в поверхностную структуру силикагеля. Такие ионы могут взаимодействовать непосредственно с веществами, содержащимися в подвижной фазе.

Чтобы свести к минимуму неоднородность поверхности, в процессе производства силикагеля принимают ряд мер к удалению металлов и превращению вицинальных и геминальных силанольных групп в независимые. Для этого используют сверхвысокочистые коллоидные растворы оксида кремния, кислотное экстрагирование геля, удаление из геля адсорбированной влаги и преобразование вицинальных и геминальных силанольных групп на поверхности геля в независимые посредством термообработки. В результате удаётся получить более однородную поверхность сорбента, благодаря чему в хроматографическом опыте достигается значительное улучшение формы пиков.

После такой предварительной обработки получают материалы классов «с деактивированной основой» и «высокой чистоты». Особое внимание при работе с колонками, заполненными такими сорбентами обращают внимание на форму пиков при разделении основных соединений, содержащих аминогруппы. Это чрезвычайно важно для испытаний активных веществ в фармацевтических препаратах, поскольку они зачастую содержат одну или несколько амино-функциональных групп.

Преимущество силикагеля как нормально-фазного сорбента заключается в высокой эффективности разделения близких по строению веществ, таких как изомеров положения (например, *о*-, *м*-, *п*-крезол), геометрических изомеров (например, *цис-транс*-изомеров), а также веществ с различной степенью ненасыщенности (например, афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2).

При использовании немодифицированного силикагеля довольно трудно организовать опыт в градиентном режиме, поскольку время повторного уравновешивания оказывается зачастую слишком большим. Кроме того,

следует избегать подвижных фаз, содержащих воду, поскольку при адсорбции воды силикагель быстро утрачивает активность, соответственно, резко ухудшается удерживание анализируемых веществ. Силикагель при этом называют *деактивированным*. Для повторного активирования силикагель промывают 2,2-диметоксипропаном*. Впрочем, Фармакопея США предписывает для преодоления трудностей, связанных с различной степенью деактивации силикагеля смешивать в известной пропорции растворитель с нулевым влагосодержанием и влагонасыщенный растворитель (например, *н*-бутилхлорид), получая таким образом элюент с воспроизводимым уровнем влагосодержания.

Если в подвижной фазе содержится вода, обычно лучше использовать нормально-фазный сорбент с привитой фазой, поскольку его выгодно отличают от немодифицированного силикагеля более короткое время уравновешивания и более высокие устойчивость и долговечность.

2.5.А.4. Модифицированные нормально-фазные адсорбенты. Подложку из силикагеля модифицируют органическими или неорганическими добавками. В частности, серийно производится силикагель, пропитанный (импрегнированный) соединениями серебра. При использовании этого сорбента удаётся эффективно разделить ненасыщенные вещества, благодаря взаимодействию ионов серебра с π–электронами. Для предотвращения десорбции серебра из подложки подвижные фазы в этом случае состоят в основном из неполярных растворителей (не менее 99 % алкана) с небольшой добавкой слабо полярного вещества (до 0,25 % ацетонитрила). Аналогичным образом работают с другими подложками, модифицированными металлом.

При использовании органических модификаторов разделение основано на процессе распределения между двумя жидкими фазами (в отличие от адсорбции, то есть распределения между жидкой и твёрдой фазами), которое имеет место при покрытии поверхности силикагеля в разной степени органическими материалами. Для получения таких модифицированных материалов приготавливают раствор модификатора в высокой концентрации в соответствующем растворителе, затем раствор прокачивают через заранее набитую колонку. При этом состав раствора на выходе колонки постоянно контролируют до стабилизации его концентрации, которая свидетельствует о достижении равновесия между органическим модификатором и подложкой. Количество подвижной фазы с покрытием по достижении истинно равновесного состояния определяется исходным количеством

---

* *Или любым другим, не содержащим влаги растворителем (прим. редактора).*

модификатора в растворителе, составом растворителя и температурой. По окончании нанесения покрытия колонку промывают подвижной фазой, которая впоследствии будет применяться в хроматографических опытах.

Основное преимущество такого подхода состоит в возможности получить набивку колонки с характеристиками, точно соответствующими потребностям разделения. Имеется множество модификаторов, что даёт большую свободу манёвра. Кроме того, количество модификатора легко регулировать, изменяя его концентрацию в растворителе в процессе нанесения покрытия. При более высоком содержании модификатора на подложку будет нанесён более толстый слой неподвижной фазы, и сорбент будет иметь более высокую силу удерживания. Но при более толстом слое подвижной фазы будет иметь место размытие хроматографических зон из-за эффектов массопереноса. При оптимальной толщине можно достичь удовлетворительного удерживания, но при этом избежать значительного размытия пиков из-за массопереноса.

Впрочем, распределительная хроматография также сопряжена с множеством трудностей. Во-первых, абсорбируемая жидкость, даже если она не смешивается с подвижной фазой, отчасти в ней растворяется. Поэтому по мере проведения хроматографических опытов количество жидкости на сорбенте постепенно уменьшается, а значит, время удерживания и разрешение уменьшаются. Чтобы избежать этого, подвижные фазы зачастую насыщают модификатором (для этого подвижную фазу приводят в соприкосновение со слоем вещества адсорбированной фазы и постоянно интенсивно перемешивают). Во-вторых, даже малые изменения температуры приводят к существенным изменениям растворимости модификатора в подвижной фазе, при этом совершенно утрачивается воспроизводимость. В-третьих, достичь воспроизводимости по толщине слоя жидкости, адсорбированного пористым веществом, крайне сложно, соответственно, от колонки к колонке будет иметь место большой разброс параметров. И наконец, как уже было сказано, при использовании таких подложек могут сильно сказываться явления массопереноса.

2.5.А.5. Нормально-фазные адсорбенты, модифицированные химическим прививанием. Из числа реактивов, позволяющих изменять силикагелевые подложки химически, первыми были открыты вещества, содержащие неполярные октадецильные функциональные группы. Такой сорбент обладал свойствами, во многом дополнительными по отношению к немодифицированному силикагелю. Поскольку эта фаза неполярная, подвижная фаза чаще всего является полярной или имеет высокое содержание воды. Эти условия как раз обратны по отношению к тем, которых требует работа с

немодифицированными сорбентами. Термины «нормально-фазный» и «обращённно-фазный» возникли именно из разграничения по полярности.

Вскоре у хроматографистов возникла потребность в материалах для более «тонкого» разделения. Были разработаны другие неполярные подложки, в первую очередь на основе октила (C_8), бутила (C_4) и фенила. К сожалению, эти неполярные подложки и высокополярные немодифицированные сорбенты ещё не давали возможности решать все задачи. Потому были найдены способы прививания фаз промежуточной полярности – с циановыми, диольными, амино-, нитрогруппами и многие другие.

Таблица 2.4

Нормально-фазные привитофазные сорбенты

Привитая фаза	Сокращённое обозначение	Структура
Цианопропил	CN	$–CH_2CH_2CH_2CN$
Нитрогруппа	NO_2	$–(CH_2)_3–C_4H_6–NO_2$
Аминопропил	NH_2	$– CH_2CH_2CH_2NH_2$
Диаэтиламиногруппа	–	$–(CH_2)_3–N(CH_3)_2$
Диол	–	$–(CH_2)_3–O–CH_2CHOHCH_2OH$

При необходимости, для таких подложек указывают содержание углерода и азота. На сегодняшний день привитофазные сорбенты как раз составляют большинство нормально-фазных. В таблице 2.4 приведены некоторые из таких фаз, используемых для неспецифического (то есть не хирального и не по специфическому сродству – аффинного) разделения.

Устойчивость, простота изготовления и воспроизводимость характеристик готовых колонок с такими фазами были настолько лучше, чем при использовании немодифицированных фаз и фаз, модифицированных нанесением, что это произвело настоящую революцию в жидкостной хроматографии. Данные фазы позволяют проводить хроматографические опыты в градиентном режиме. Уравновешивание происходит несоизмеримо быстрее, чем на немодифицированных материалах. Благодаря этому, для таких фаз удалось разработать огромное количество методик. Группы веществ, анализируемых при помощи этих методик, включают важнейшие загрязнители окружающей среды, действующие вещества фармацевтических препаратов, природные вещества.

Хотя по определению эти фазы являются полярными, очень быстро выяснилось, что их можно применять и в системах с высокополярными

подвижными фазами. Сорбенты, обладающие промежуточной полярностью использовались там, где применение обычной нормально-фазной хроматографии было невозможно, – для анализа пептидов, белков и широкого спектра действующих веществ фармацевтических препаратов и природных соединений.

Следствием такой *двойственности применения* полярных сорбентов стало некое стирание граней между нормальной и обращённой фазами. Однако на практике чёткость классификации не играет особой роли. Обычно решается вопрос о применимости того или иного метода разделения. Поэтому лучше всего различать методы анализа, указывая, какие сорбенты и подвижные фазы следует применять для данного разделения. При этом всякая путаница будет исключена.

Довольно часто конечные функциональные группы нормально-фазных сорбентов обладают повышенной реакционной способностью по отношению к реактивам, широко используемым для получения производных, таких как хлордиметилсиланам. Как показано на рис. 2.20, многие сорбенты получены на основе триалкоксиалкил-замещённых силанов. Из-за упомянутой реакционной способности конечных функциональных групп окончательное блокирование функциональных групп на поверхности силикагеля («энд-кэппинг») таких сорбентов часто не производится. Селективность и специфичность таких сорбентов можно регулировать, подбирая «нормально-фазную» часть молекул «прививки». Например, цианопропиловая фаза проявляет слабополярные свойства и является слабым акцептором при образовании водородных связей; диольные и аминофазы сильнополярны и являются сильными акцепторами и донорами при образовании водородных связей; нитрофазы чрезвычайно сильно полярны и выступают в роли сильных акцепторов при образовании водородных связей.

Фторсодержащие молекулы являются нормально-фазными «прививками» формируя сорбенты, находящие достаточно узкие применения. Они

$$\mathrm{Si{-}OH} + (CH_3CH_2O)_3SiCH_2CH_2CH_2CN \xrightarrow{\text{толуол}} \mathrm{Si{-}O{-}Si(OCH_2CH_3)_2CH_2CH_2CH_2CN} + CH_3CH_2OH$$

Рис. 2.20. Реакция получения производных триэтоксицианопропилзамещённого силана с силанольными группами на поверхности силикагеля. Если на поверхности достаточно близко к другим этоксигруппам имеются реакционноспособные силанольные группы, они могут также вступать в реакцию, образуя связанные группы с двумя или тремя связями с поверхностью силикагеля.

содержат гептадекафторооктиловые и перфторфениловые привитые фазы. Вполне естественно, общая удерживающая способностью таких сорбентов существенно ниже, чем соответствующих обращённо-фазных. Однако уникальная π-π-структура этих фаз обеспечивает селективность по отношению к некоторым функциональным группам, недостижимую при использовании аналогичных углеводородных фаз.

2.5.А.6. Применение. Нетрудно представить себе, сколь обширен перечень анализов, реализуемых на таких колонках, однако два направления заслуживают особого упоминания. В первом применяется колонка с аминопропиловой фазой и используется смесь ацетонитрила с водой в качестве подвижной фазы. Это позволяет разделять смеси сахаров, причём зачастую данный способ предпочтительнее, чем анионнообменный, где применяют сильноосновную подвижную фазу (см. раздел 2.9). Во втором привлекают немалый интерес колонки с цианопропиловой привитой фазой, поскольку она позволяет работать с белками и пептидами. Впрочем, для разделения белков в последнее время стали шире использоваться колонки большого диаметра с бутилсодержащей фазой.

2.5.Б. Обращённо-фазная привитофазная хроматография

Обращённо-фазные сорбенты применяются в 80 % лабораторий, где используют ВЭЖХ, что говорит об их безусловной важности. Сорбенты этого типа можно разделить на две группы по конфигурации неполярной функциональной группы: линейные алкилы (например, C_{18}) и со встроенным углеводородным кольцом (например, фенил). Перечень обращённо-фазных сорбентов приведён в таблице 2.5.

Анализ литературы по ВЭЖХ показывает со всей очевидностью, что обращённо-фазную хроматографию используют почти во всех видах анализа для разделения практически любых веществ. Чаще всего при этом используются колонки на основе силикагеля, модифицированном октадецилом (C_{18}). Хотя нет никаких причин изначально отдавать предпочтение C_{18} по сравнению с C_8 или C_4, в практике хроматографии так часто происходит из-за того, что документированных и валидированных методик ВЭЖХ на сорбенте C_{18} гораздо больше, чем при использовании остальных. Соответственно, значительно больше известно и о разработках и изменениях таких методик. Как следствие, типов сорбентов, на основе «C_{18}» выпускается больше, чем других. Логично далее рассмотреть порядок приготовления самого сорбента.

Таблица 2.5

Обращённо-фазные привитофазные сорбенты

Привитая фаза	Сокращённое обозначение	Структура
Диметил		$–(CH_3)_2$
Триметил (метил)	C_1	$–(CH_3)_3$
Этил	C_2	$–CH_2CH_3$
Бутил	C_4	$–CH_2CH_2CH_2CH_3$
Циклогексил	CH	$–CH_2CH_2CH_2C_6H_{11}$
Гексил	C_6	$–CH_2(CH_2)_4CH_3$
Фенил [а)]		$–CH_2CH_2CH_2C_6H_5$
Октил	MOS, C_8	$–CH_2(CH_2)_6CH_3$
Внедрённый октил [б)]		$–CH_2CH_2CH_2OCONHCH_2(CH_2)_6CH_3$
Октадецил	ODS, C_{18}	$–CH_2(CH_2)_{16}CH_3$
Внедрённый октадецил [в)]		$–CH_2CH_2CH_2NHCOCH_2(CH_2)_{16}CH_3$

а) Фенильная привитая фаза также производится без пропилового разделителя, т.е. $–C_6H_5$. Она менее устойчива, чем приведённая в таблице.

б) Фирменное наименование «Симметри-шилд C_8».

в) Фирменное наименование «Супелкосил ABZ C_{18}».

2.5.Б.1. Химия поверхности силикагеля и получение привитофазных сорбентов. Поверхность силикагеля имеет в основном тот же характер, что был описан в разделе 2.5.А.3.А. Однако процесс её дальнейшей дериватизации существенно отличается от используемого при изготовлении нормально-фазных привитофазных сорбентов. Поскольку нормально-фазные функциональные группы не обладают реакционной способностью, в качестве реагента для дальнейшей модификации поверхности чаще всего используют трихлоралкилсилан или хлордиметилалкилсилан. Последний вступает в реакцию по схеме, показанной на рис. 2.21.

Уже исходя из выбора указанных реагентов для получения производных на поверхности, можно судить о том, насколько многочисленны варианты изготовления колонок C_{18}. Например, C_{18} может быть:

1. С высокой или низкой нагрузкой.
2. С блокированием остаточных групп – «энд-кэппингом» (для этого используется весьма широкий спектр реактивов) или без него.
3. С деактивированной основой или необработанной.
4. Полимерный или мономерный.

Поясним сказанное подробнее. Во-первых, *нагрузкой* называется содержание привитой фазы, характеризующееся массовой долей углерода (обозначается %C). C_{18} с низким содержанием привитой фазы имеет %C не более 8 %, тогда как с высоким – свыше 12 %. С практической точки зрения увеличение содержания углерода в составе сорбента имеет два последствия: большее количество силанольных групп преобразуются в связанную форму, а поверхность становится более гидрофобной (неполярной).

Дериватизация силанольных групп поверхности силикагеля полезна в тех случаях, когда разделяемые вещества подвергаются сильному взаимодействию с ними за счет образования водородных связей (более подробно см. раздел 3.9.А). Бóльшая углеродная нагрузка также повышает удерживающую способность сорбента. Колонка при этом становится более универсальной и позволяет разделять большее количество веществ.

К сожалению, из-за размеров молекул C_{18} значительная часть поверхностных силанольных групп (обычно 50 % или более) не вступает в реакцию, поскольку связанные группы C_{18} представляют собой стерическое препятствие для других. Для дальнейшего снижения количества силанольных групп на поверхности разработан процесс, получивший название *блокирования остаточных групп или «энд-кэппинга»*. Здесь используется реагент с малыми размерами молекул (например, хлортриметилсилан) который «просачивается» между группами C_{18} и реагирует с остаточными непрореагировавшими силанольными группами (см. рис. 2.21 Б). После энд-кэппинга %C возрастает незначительно, зато процент немодифицированных силанольных групп становится менее 50 %.

Чтобы ещё больше снизить влияние остаточных силанольных групп на хроматографические параметры, перед химическим модифицированием силикагель *основы* может быть обработан дополнительно. Обычно такая обработка сводится к вытравливанию из силикагеля примесей металлов с помощью кислоты. В результате поверхность становится более однородной. Дополнительно с целью повышения химической однородности поверхности силикагель особым образом высушивают.

Ещё одной возможностью предотвратить реакции силанольных групп с анализируемыми веществами является создание *полимерных* цепей групп

C_{18}, ориентированных параллельно поверхности внутри сорбента. Такая схема представлена на рис. 2.21 В. Процесс предполагает серию реакций трихлороктадецилсилана с поверхностью, с последующей промывкой водным раствором для преобразования остальных хлорсилановых групп в реакционноспособные силанольные группы. На последнем этапе осуществляется блокирование остаточных силанольных групп хлортриметилсиланом.

К преимуществам таких сорбентов более высокая удерживающая способность и меньшее влияние силанольных групп. Их главными недостатками являются больший разброс характеристик конечного материала (поскольку процесс полимеризации не поддаётся точному управлению), а также отрицательное влияние массопереноса, проявляющегося на молекулярном уровне в толстом полимеризованном слое сорбента. Вследствие этого полимеризованные сорбенты как таковые находят ограниченное применение.

2.5.Б.2. Градиентный режим. Режим градиентного элюирования в ВЭЖХ означает, что в процессе разделения состав подвижной фазы изменяется. Хотя понятия «типичный градиентный режим» не существует, чаще всего используются два варианта: линейное изменение состава и выдерживание состава постоянным в течение некоторого времени с последующим линейным изменением. Градиентный режим используют для того, чтобы вводить пробу в очень слабую подвижную фазу. При таких условиях анализируемые вещества сосредоточиваются в головной части колонки. С точки зрения термодинамики процесса, ясно, что зоны анализируемых веществ сразу же начнут медленно продвигаться по колонке, претерпевая при этом размытие. Если быстро увеличивать силу элюента, это приводит к быстрой десорбции анализируемых веществ в конце зоны и повторному сужению, фокусировке этих зон в колонке. Таким образом, в градиентном режиме можно получить более узкие пики в конце хроматограммы.

Градиентный режим обладает тремя потенциальными преимуществами перед изократическим:

1. В градиентном режиме ёмкость колонки выше, чем в изократическом.
2. В градиентном режиме общая продолжительность элюирования меньше, чем в изократическом.
3. В градиентном режиме удаётся получить более узкие пики, что улучшает условия детектирования.

А

Si–OH Si–OH Si–OH + CH_3 | $ClSiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$ | CH_3 → (толуол, пиридин) Si–OH Si–OSi(CH_3)$CH_2(CH_2)_{16}CH_3$ (CH_3) Si–OH + NH^+Cl^-

Б

Si–OH Si–OSi(CH_3)$CH_2(CH_2)_{16}CH_3$ (CH_3) Si–OH + $ClSi(CH_3)_3$ → (толуол, пиридин) Si–OSi$(CH_3)_3$ Si–OSi(CH_3)$CH_2(CH_2)_{16}CH_3$ (CH_3) Si–OH + NH^+Cl^-

В

$$\equiv Si{-}OH + Cl_3SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3 \xrightarrow[\text{пир.}]{\text{тол.}} \equiv Si{-}O\overset{Cl}{\underset{Cl}{Si}}CH_2(CH_2)_{16}CH_3 + \text{пир.:}HCl + 2H_2O \xrightarrow[\text{пир.}]{\text{тол.}} \equiv Si{-}O\overset{OH}{\underset{OH}{Si}}CH_2(CH_2)_{16}CH_3 + 2\text{пир.:}HCl,$$

$$\equiv Si{-}O\overset{OH}{\underset{OH}{Si}}CH_2(CH_2)_{16}CH_3 + Cl_3SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3 \xrightarrow[\text{пир.}]{\text{тол.}} \equiv Si{-}O\overset{Cl}{\underset{O{-}SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3}{Si}}CH_2(CH_2)_{16}CH_3 + \text{пир.:}HCl \longrightarrow \text{и т.д.}$$

Рис. 2.21. (А) Реакция получения производных силанольных групп на поверхности силикагеля с помощью хлордиметилоктадецилсилана. (Б) Реакция окончательного покрытия («энд-кэппинга») остаточных силанольных групп с помощью хлортриметилсилана. (В) Образование полимеризованной подложки C_{18} с помощь трихлороктадецилсилановой последовательности.

При этом изократический режим обладает следующими преимуществами перед градиентным:

1. Система насосов и управления ими для изократической хроматографии существенно ниже по стоимости и дешевле в обслуживании.
2. В изократическом режиме не требуется уравновешивание колонки после анализа.
3. В изократическом режиме отсутствует дрейф нулевой линии, вызванный изменением состава элюента.
4. В изократическом режиме можно применять любые детекторы.

Параметры градиентного режима (форма, скорость изменения, продолжительность участка с постоянным составом, начальный состав, конечный состав) определяются типом и количеством анализируемых веществ в пробе. Чтобы задать градиентный режим, необходимо описать изменение состава в зависимости от времени на всю продолжительность анализа, а не только до момента достижения наибольшей силы элюента. Пример однозначного описания градиентного режима приведён ниже.

Расход 1,2 мл/мин

Время, мин	% А	% Б
0,0	100	0
5,0	100	0
20,0	70	30
25,0	45	55
30,0	45	55
31,0	100	0

Уравновешивание до ввода следующей пробы 5 мин.

Здесь % А обозначает долю элюента А в подвижной фазе в момент ввода пробы, 0,0 мин. Момент ввода следующей пробы снова считается нулевым. Состав подвижной фазы не изменяется в течение 5,0 мин, затем в течение следующих 15 мин изменяется со скоростью минус 2 % А в минуту (+ 2 % Б в минуту). На 20 минуте скорость изменения состава возрастает до минус 5 % А в минуту (+ 5 % Б в минуту). После 25 минуты состав подвижной фазы остаётся неизменным в течение 5 мин. Этот участок зачастую именуют *плато*. Затем состав подвижной фазы быстро изменяют до перво-

начального. Здесь скорость изменения не важна, поскольку все анализируемые вещества уже элюированы. Важным этапом, о котором часто забывают, здесь является уравновешивание колонки. По этому поводу можно либо записать примечание, как это сделано выше, либо ввести в таблицу описания градиентного режима дополнительную строку (в данном примере указать для времени 36,0 100 % А и 0 % Б). Разумеется, во всех точках градиентного режима сумма % А и % Б *должна* равняться 100 %.

Помимо параметров градиентного режима, необходимо выбрать элюенты А и Б. К примеру, А может представлять собой смесь 20 % ацетонитрила и 80 % воды (в объёмных долях), а Б – смесь 75 % ацетонитрила и 25 % воды (также в объёмных долях). Фактический состав подвижной фазы на выходе насоса в момент времени 25,0 мин будет таким: ацетонитрила – (0,45 х 20) + (0,55 х 75) = 55,25 %; воды – (0,45 х 80) + (0,55 х 25) = 49,75 %. Для проверки: 55,25 % + 49,75 % = 100 %.

Чаще всего в градиентном режиме начинают опыт в условиях, когда состав подвижной фазы самый слабый (со слабого элюента) и постепенно увеличивают его силу. Однако в опытах, где критическим фактором является растворимость анализируемых веществ или сохранение их трёхмерной структуры (как например, в случае некоторых белков и пептидов), более эффективно использование так называемого обращённого градиентного режима. В этом случае в начале опыта состав подвижной фазы наиболее силён (подвижная фаза содержит больше всего органического растворителя), а в процессе опыта его сила постепенно снижается (то есть в его составе становится больше воды).

В последнее время привлекает интерес новый вариант обращённо-фазной хроматографии, в котором используются безводные подвижные фазы. Такой процесс получил название *безводной обращённо-фазной хроматографии* и нашёл применение для анализа проб, содержащих анализируемые вещества, сильно различающиеся по размеру молекул, растворимости и устойчивости.

Хотя градиентный режим успешно применяется как на немодифицированных, так и на нормально-фазных привитофазных сорбентах, всё же большая часть соответствующих методик разработана для обращённо-фазного варианта. Чтобы подчеркнуть преимущества градиентного режима, заметим в заключение, что в этом режиме достигалось разделение двадцати и более анализируемых веществ в пробе.

2.5.Б.3. Применение. Согласно публикациям, обращённо-фазная хроматография используются в тысячах случаев. Ежемесячно в таких изданиях, как «Джорнал оф хроматографи», «Джорнал оф хроматографик сайенс» и

«Джорнал оф ликвид хроматографи» публикуются описания десятков новых методик.

2.5.В. Ион-парная хроматография

Ион-парная хроматография (также называется парно-ионной, хроматографией с использованием поверхностно активных веществ – ПАВ) предполагает, что в элюенте содержатся противоионы, заряд которых противоположен заряду анализируемого вещества. Разделение может быть как нормально-фазным, так и обращённо-фазным. Однако в большинстве случаев используют привитые фазы, совместимые с водными буферами, входящими в состав подвижной фазы. Такими фазами являются C_{18} и C_8.

Ион-парная хроматография (ИПХ) применяется в основном для анализа веществ, имеющих постоянный заряд (например, четвертичных аминов) или способных приобретать заряд (например, первичных аминов и карбоксиловых кислот). Для этой цели элюент должен содержать буфер для регулирования pH и обеспечения постоянства заряда анализируемых веществ. Формирование ионных пар при этом обеспечивается за счёт введения в элюент противоионов. Обычно для анализа анионогенных веществ для этой цели используют соли тетраалкиламмония, а для катионогенных – алкилсульфонаты и алкилсульфаты.

В качестве иллюстрации рассмотрим пример, в котором анализируемое вещество, C^+ является катионогенным. Уравнение равновесия с анионным ион-парным реагентом, IP^-, имеет вид

$$IP^- + C^+ \leftrightharpoons \{IP^- C^+\}$$

где $\{IP^- C^+\}$ – ион-парный комплекс образующийся в результате реакции. Соответствующая схема показана на рис. 2.22. Распределение проходит по двум неразличимым механизмам. Первый состоит в образовании пар ионов в растворе с последующим равновесием с поверхностью. Второй – в адсорбции ион-парного реагента поверхностью, где несвязанное анализируемое вещество взаимодействует с ним. По-видимому, в действительности имеют место оба эти процесса, причём преобладает первый, поскольку обычно содержание ион-парного реагента в растворе значительно выше, чем анализируемого вещества. В результате хроматографическое распределение описывается как распределение уже не просто молекул аналита между подвижной и неподвижной фазами, а собственно ионных пар:

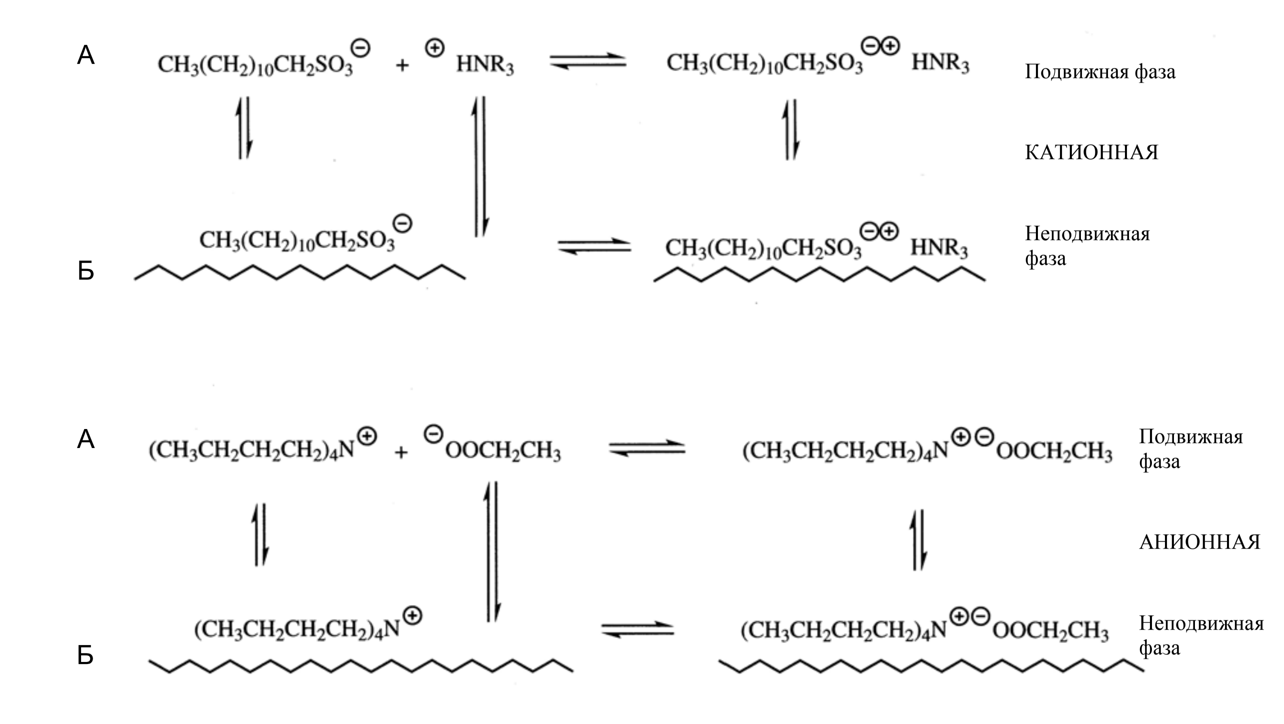


Рис. 2.22. Ион-парное разделение. (А) В подвижной фазе образуются ионные пары, которые распределяются в неподвижную фазу как единое целое. (Б) Ионные пары образуются после распределения анализируемого вещества в неподвижную фазу.

$$\{IP^-C^+\}_{mp} \leftrightharpoons \{IP^-C^+\}_{sp},$$

где $\{IP^-C^+\}_{mp}$ – содержание ионных пар в подвижной фазе, $\{IP^-C^+\}_{sp}$ – их содержание в неподвижной фазе. Общая константа равновесия описывается при этом выражением

$$K_{eq} = [\{IP^-C^+\}_{sp}] / [\{IP^-C^+\}_{mp}] = [\{IP^-C^+\}_{sp}] / [(IP^-_{mp}] \text{ x } [C^+_{mp}],$$

а коэффициент ёмкости приобретает вид

$$k' = (V_{sp} / V_{mp})\, K_{eq} \text{ x } [C^+_{mp}],$$

где V_{sp} и V_{mp} – объёмы, соответственно, неподвижной и подвижной фаз. Отсюда можно сделать два важных вывода: во-первых, чем выше концентрация ион-парного реагента, тем сильнее удерживание анализируемого вещества; во-вторых, чем больше сродство ион-парного реагента к неподвижной фазе, тем больше время удерживания разделяемого вещества.

Вышесказанное позволяет прийти также к следующим практическим соображениям:

1. Чтобы ИПХ была эффективной и воспроизводимой, до начала анализа должно быть достигнуто полное равновесие ион-парного реагента между подвижной и неподвижной фазами.
2. Поэтому при использовании градиентного режима весьма важно уравновешивание между вводами проб.
3. Концентрация ион-парного реагента в подвижной фазе должна быть значительно больше, чем концентрация анализируемых веществ, чтобы все эти вещества образовали комплексы в процессе элюирования.
4. В подвижной фазе должен содержаться буфер, причём в большей концентрации, чем как ион-парный реагент, так и анализируемые вещества, чтобы ионная сила не изменялась в процесс элюирования.

Рассмотрим эти соображения по отдельности. Для уравновешивания колонки с сорбентом C_{18} с простой подвижной фазой – смесью ацетонитрила и воды – обычно требуется пропустить 5 – 10 объёмов колонки. В случае ион-парного реагента, поскольку прежде всего нужно насытить поверхность сорбента этим реагентом, а затем уравновесить, процесс может потребовать 20 и более объёмов колонки. Очевидно, что главным является процесс насыщения поверхности, и чем ниже концентрация ион-парного реагента, тем больше времени этот процесс займёт. Чтобы упростить эту задачу, известны два подхода. Первый состоит в том, чтобы оставить хроматографическую установку для уравновешивания на ночь на понижен-

ном расходе. Второй – в том, чтобы для каждого варианта ион-парного разделения использовать свою колонку.

Если опыт проводится в режиме градиента состава подвижной фазы, время уравновешивания в ИПХ будет гораздо больше, чем при неизменном составе. Для уравновешивания между вводами последовательных проб может понадобиться 10 и более объёмов колонки (заметим, что это меньше, чем 20 и более объёмов, необходимых для начального уравновешивания, поскольку в этом случае поверхность сорбента уже насыщена ион-парным реагентом). Чем выше концентрация ион-парного реагента, тем это время меньше. Тем не менее, сравнительно большая длительность уравновешивания между вводами последовательных проб относится к недостаткам ИПХ.

Что касается соотношения концентраций ион-парного реагента, буфера и анализируемых веществ, заметим, что если pH раствора совпадает с pK_a анализируемого вещества, всего 50 % молекул определяемого вещества будут иметь заряд. Если pH отличается от pK_a на ± 1, 90 % молекул вещества приобретет заряд. Чтобы добиться ионизации 99 % анализируемого вещества, pH должен отличаться от pK_a на ± 2. Дальнейшее увеличение разницы между pH и pK_a, то есть более, чем на 2 единицы, не даёт сколь-нибудь заметных преимуществ. Это соотношение показано на рис. 2.23 для бензойной кислоты при $pK_a \approx 4{,}2$. С учётом сказанного, обычно рекомендуется обеспечивать разницу между pH и pK_a не менее ± 1. Чем больше отличается pH от pK_a, тем слабее будут сказываться на удерживании небольшие изменения состава подвижной фазы. Главное, что следует помнить, – водородный показатель водного раствора *не совпадает* с водородным показателем смеси воды и органического растворителя (например, воды с метанолом). В этих случаях лучше работать при самом низком или самом высоком значении pH, при котором буфер ещё сохраняет растворимость, а полученный раствор совместим с разделяемыми веществами, колонкой и детектором.

2.5.В.1. Применение. ИПХ можно успешно применять для ионогенных либо легко ионизируемых соединений. С одной стороны, успешно реализован мета-ионный анализ с использованием лигандов металла в подвижной фазе; здесь лиганды выступают в качестве ион-парных реагентов. Методом ИПХ осуществляется поточный анализ первичных и вторичных аминов, карбоксиловых кислот. Следует помнить, что в этих случаях молекулы анализируемого вещества должны быть ионизированы, соответственно, анализ аминов производится как правило в сильнокислой, а карбоксиловых кислот – в слабокислой или нейтральной среде.

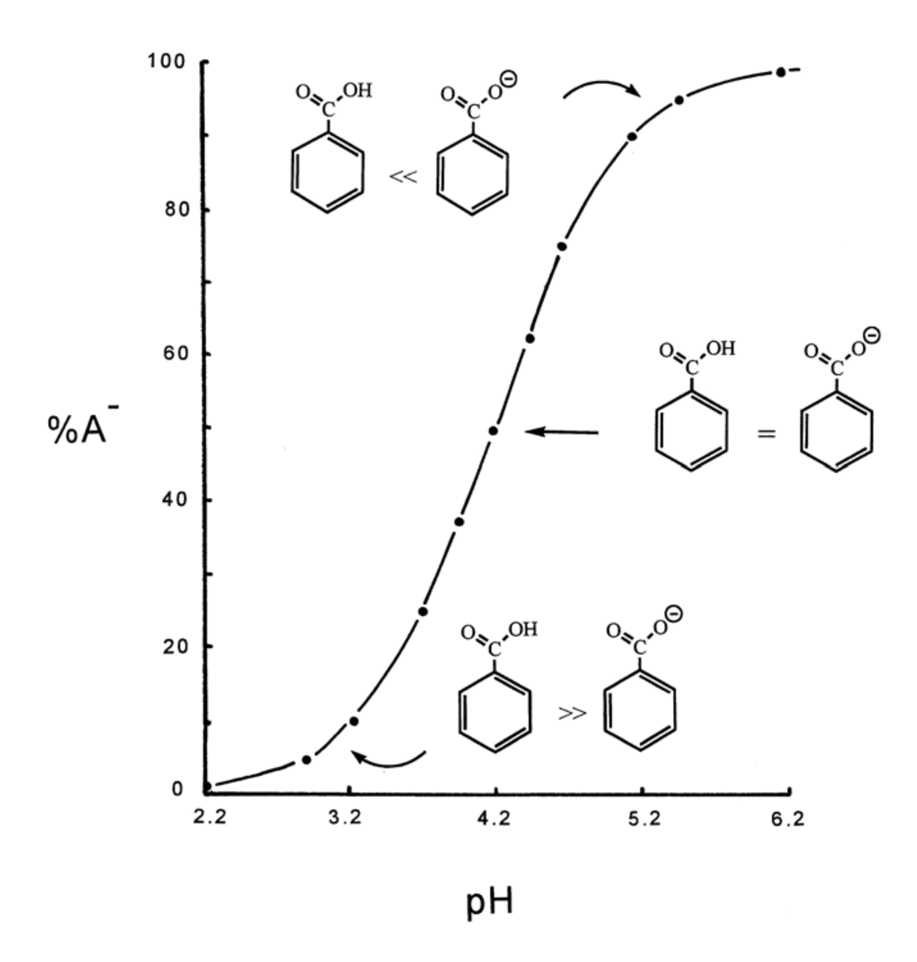


Рис. 2.23. Кривая диссоциации кислоты HA для разных pH раствора. Следует обратить внимание на форму кислоты и соответствующего основания в случаях, когда pH << pK_a и pH >> pK_a.

2.5.Г. Ионообменная хроматография

Разделение и анализ ионогенных соединений весьма важны. В предыдущем разделе представлен один из методов такого анализа – ИПХ. Другим является ионообменная хроматография (ИОХ). ИОХ особенно целесообраз-

но применять для разделения соединений с малой молекулярной массой и большим зарядом. Например, Агентство по охране окружающей среды США предписывает постоянный текущий контроль содержания многочисленных анионов в питьевой воде (например, NO_2^-, NO_3^-,) именно с помощью ИОХ. В промышленности проводят контроль за составом сточных вод на присутствие как катионов (например, Cu^{2+}, Cr^{6+}), так и анионов (например, SO_3^{2-}, CN^-). С помощью как катионного, так и анионного обмена удаётся разделить и проанализировать аминокислоты. Соответственно, спектр областей применения ионообменного метода весьма широк.

Чтобы лучше понять сущность метода, рассмотрим три класса ионов, а именно, *катионы*, обладающие положительным зарядом, *анионы*, несущие отрицательный заряд, и *амфоионы или цвиттерионы*, молекулы которых имеют как положительный, так и отрицательный заряды, разнесённые в пространстве. Чтобы осуществить хроматографическое разделение, на поверхности должны иметься заряды со знаком, противоположным знаку заряда молекул определяемого вещества.

2.5.Г.1. Сорбенты для ионообменной хроматографии. В ИОХ используют ионообменные материалы на основе силикагеля или на полимерной основе. Они имеют свои преимущества и недостатки. Материалы на силикагелевой основе подвержены быстрому ухудшению свойств в случае использование высокоионных подвижных фаз или подвижных фаз с высоким (свыше 7) или низким (менее 2) pH. К сожалению, такие условия как раз достаточно типичны для ионообменной хроматографии. Можно либо использовать предколонки для защиты аналитических колонок, либо перейти на другой тип основы – органические полимеры.

Многие ионообменные материалы изготавливают именно на основе органических полимеров (например, сополимера стирола и дивинилбензола). Такие материалы весьма устойчивы к воздействию высокоионных, сильнокислых и сильноосновных подвижных фаз. Однако и полимерным материалам присущ недостаток, заключающийся в необходимости повторного уравновешивания при каждом переходе на другую подвижную фазу. Этот недостаток не был бы столь уж значительным, если бы не свойство полимеров существенно изменяться в размерах в процессе уравновешивания. Такое изменение называют *набуханием* или *усадкой*. Проще говоря, полимерная структура расширяется или сжимается при впитывании подвижной фазы или при её утрате.

Как катионообменные, так и анионообменные материалы характеризуются тремя важными параметрами: типом поверхностных функциональных групп (т.е. типом ионообменника), типом противоионов и ионообмен-

ной ёмкостью. Важность функциональных групп и противоионов будет понятна из дальнейшего рассмотрения. Ионообменная ёмкость же является мерой доступных ионогенных групп на поверхности материала, выраженной в миллимоль-эквивалентах на грамм (сухой массы). Для аналитических колонок этот показатель варьирует от 0,5 до 5 мМ-экв/г.

Основные параметры ионообменного разделения одни и те же как для анионообменных, так и для катионообменных материалов. В любом случае ионы определяемого вещества должны достичь равновесного состояния при взаимодействии с поверхностью. Элюирование обусловлено тем, что ионы анализируемого вещества конкурируют с ионами, содержащимися в подвижной фазе. При изменении типа или содержания конкурирующих ионов в подвижной фазе будет изменяться удерживание.

2.5.Г.2. Катионообменные материалы и примеры разделения. *Катионообменные материалы (катиониты)* несут отрицательный заряд и используются для разделения веществ, содержащих катионы. Разделение основывается на силе равновесного взаимодействия ионов анализируемых веществ с поверхностью. Для катионитов указанное равновесие описывается следующим образом:

$$\mathrm{P{-}SO_3^{-}H^{+} + K^{+} \leftrightharpoons P{-}SO_3^{-}K^{+} + H^{+}},$$

где P – поверхность полимера. Константа равновесия между ионами калия и поверхностью описывается следующим выражением:

$$K = [\mathrm{H^{+}}][\mathrm{P{-}SO_3^{-}K^{+}}] \,/\, [\mathrm{P{-}SO_3^{-}H^{+}}][\mathrm{K^{+}}]$$

Взаимодействие представляется несложным. Однако важно иметь в виду, что сульфонатная группа (SO_3^-) присутствует не в чистом виде, а имеет связанный с ней положительный ион водорода. Ион водорода является противоионом и ионом, который обменивается в процессе уравновешивания. Чтобы было обеспечено удерживание K^+, он должен заместить ион H^+ сульфонатной группы. Это говорит о том, насколько важен для разделения правильный выбор противоиона.

Ионообменный материал можно обработать, например, гидроокисью натрия. В равновесном состоянии сульфонат на поверхности из $SO_3^-H^+$ превращается в $SO_3^-Na^+$. Естественно, при этом изменится константа равновесия *K*, так теперь K^+ обменивается не с H^+, а с Na^+. Обратите также внимание на то, что противоион должен содержаться в подвижной фазе, чтобы поверхностные ионогенные группы пришли в исходное состояние перед вводом следующей пробы.

Ионообменные материалы отличаются по константам равновесия для разных катионов. Обычно порядок уменьшения *K* таков:

$$Ba^{+2} > Pb^{+2} > Ca^{+2} > Cu^{+2} > Mg^{+2} > K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > H^{+}$$

Самым слабым является взаимодействие сорбента с H^+. Следует также помнить, что константа равновесия зависит от ионной силы, то есть приведённый ряд активности относится к пробам, в которых содержание ионогенных веществ примерно одинаковое. Слабое взаимодействие H^+ с поверхностью говорит о том, что при катионообменном разделении лучше всего использовать именно этот противоион. К тому же, как ясно и из общих соображений, чем выше заряд, тем сильнее взаимодействие с ионообменным материалом.

Чтобы точно подобрать порядок элюирования и времена удерживания, у хроматографиста в распоряжении имеется целый ряд параметров. Конечно, важен выбор элюирующих ионов. Промышленность выпускает соли аммония, калия и натрия высокой чистоты, достаточно слабо взаимодействующие с поверхностью. Сильное взаимодействие, например, ионов тяжёлых металлов, можно ослабить, добавляя в подвижную фазу комплексообразующие лиганды. К примеру, оксалат, цианид, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и НТА (нитрилтриацетат) эффективно изменяют заряд ионов металлов за счёт комплексообразования, что соответственно, меняет порядок их элюирования и времена удерживания.

Катионообменные материалы разделяют на *слабые* и *сильные*. Сильные катионообменные материалы обычно содержат сульфонатные функциональные группы, а слабые – карбоксилатные (рис. 2.24).

А SCX $-(CH_2)_3-C_6H_4-SO_3^-$

Б WCX $-(CH_2)_3-C_6H_4-COO^-$

Рис. 2.24. Катионообменные функциональные группы в сильных (А) и слабых (Б) катионитах.

2.5.Г.3. Анионообменные материалы и примеры разделения. *Анионообменные материалы (аниониты)* несут положительный заряд и используются для разделения веществ, содержащих анионы. Разделение основывается на разности в силе равновесного взаимодействия ионов анализируемых веществ с поверхностью. Для анионитов указанное равновесие описывается следующим образом:

$$P–N(CH_3)_3^{+}OH^{–} + NO_3^{–} \leftrightharpoons P–N(CH_3)_3^{+}NO_3^{–} + OH^{–},$$

где P – поверхность полимера. Константа равновесия между нитрат-ионами и поверхностью описывается следующим выражением:

$$K = [OH^{–}][P–N(CH_3)_3^{+}NO_3^{–}] / [P–N(CH_3)_3^{+}OH^{–}][NO_3^{–}]$$

Взаимодействие кажется несложным. Однако важно иметь в виду, что четвертичная аминогруппа ($N(CH_3)_3$) присутствует не в чистом виде, а имеет связанный с ней ион гидроксила. Ион гидроксила и является противоионом и ионом, который обменивается в процессе уравновешивания. Чтобы было обеспечено удерживание $NO_3^{–}$, он должен конкурировать с четвертичной аминогруппой. Это говорит о том, насколько важен для разделения правильный выбор противоиона.

Ионообменный материал можно обработать, например, хлоридом натрия. В равновесном состоянии четвертичный амин на поверхности из $N(CH_3)_3^{+}OH^{–}$ превращается в $N(CH_3)_3^{+}Cl^{–}$. Естественно, при этом изменится константа равновесия *K*, так теперь $NO_3^{–}$ обменивается не с $OH^{–}$, а с $Cl^{–}$.

Ионообменные материалы отличаются по константам равновесия для разных анионов. Обычно порядок уменьшения *K* таков:

$$\text{цитрат} > CrO_4^{–2} > PO_4^{–3} > \text{оксалат} > SO_4^{–2} > NO_3^{–} > Br^{–} > NO_2^{–} > Cl^{–} > \text{ацетат} > OH^{–} > F^{–}.$$

Взаимодействие с $OH^{–}$ является очень слабым. Слабое взаимодействие $OH^{–}$ с поверхностью говорит о том, что при анионообменном разделении лучше всего использовать именно этот противоион.

Успешное разделение амфолитов (соединений, которые могут ионизироваться как положительно, так и отрицательно, например, $HPO_4^{–2}$) может быть осуществлено только при надлежащем подборе pH подвижной фазы и обеспечении его постоянства.

Анионообменные материалы разделяют на *слабые* и *сильные*. Сильные анионообменные материалы обычно содержат функциональные четвертичные аминогруппы, а слабые – первичные аминогруппы (рис. 2.25).

А SAX —$(CH_2)_3$—C_6H_4—$CH_2N^{+}(CH_3)_3$

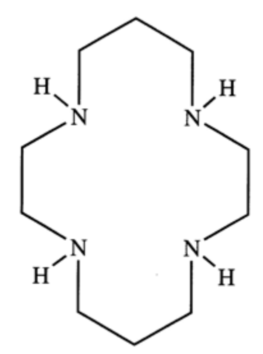
Б WAX —$(CH_2)_3$—C_6H_4—$CH_2NH_3^{+}$

Рис. 2.25. Анионообменные функциональные группы в сильных (А) и слабых (Б) анионитах.

2.5.Г.4. Ионообменные материалы не несущие зарядов и примеры разделения. Освоение промышленного производства краун-эфиров, краун-тиэфиров, циклических полиаминов и криптандов поистине стало началом эпохи новых возможностей ионного обмена. На рис. 2.26 показаны структуры некоторых типичных циклических молекул с внутренней полостью; наиболее распространены краун-эфиры. Эти соединения дали возможность получить катионообменные материалы, специфичность которых определяется размерами полости. Если молекулы ионообменника имеют двумерную кольцевую структуру (как у краун-соединений), можно подобрать такой размер кольца, чтобы обеспечивалось взаимодействие с катионами одного класса (например, краун-эфиры целесообразно использовать с щелочными металлами – Li^+, K^+, Na^+). Соединения с трёхмерной структурой (например, криптанды) удаётся «настроить» на один конкретный катион.

2.5.Г.5. Детекторы, используемые в ионообменной хроматографии. Во многих случаях в ионообменной хроматографии используются оптические детекторы ультрафиолетового и видимого диапазонов, однако наиболее распространены кондуктометрические детекторы, обеспечивающие, к тому же, самую высокую чувствительность. Отклик такого детектора определяется изменением проводимости раствора в кювете. Чем больше зарядов имеется в растворе в кювете, тем выше проводимость. Используются также амперметрические и кулонметрические детекторы (сигнал в которых

дибензо-14-краун-4



1,4,7,11-тетраазациклодекан (циклам)

Рис. 2.26. Структуры внутримолекулярных полостей ионообменных соединений: краун-эфир (вверху) и циклическая тетрааза (внизу).

зависит от тока, генерируемого в результате окислительно-восстановительных реакций на поверхности электрода), однако здесь мы их рассматривать не будем.

Изначально пределы обнаружения веществ с помощью кондуктометрических детекторов были довольно большими, кроме того, эти детекторы отличались высоким уровнем шума нулевой линии, поскольку для элюирования требовались растворы электролита (образующего противоионы) высокой и зачастую не одинаковой концентрации. Изобретение подавительных колонок позволило резко снизить уровень фонового шума.

Подавительная колонка по сути нейтрализует высокую кислотность или основность благодаря использованию ионообменной мембраны. Проба проходит через центр мембраны, а периферия мембраны постоянно промывается регенерирующим раствором.

К примеру, для разделения катионогенных соединений обычно используют растворы с высокой кислотностью. Мембрана в подавительной колонке пропускает ионы гидроксида и хлорида, но препятствует переносу катионов. Широкое применение в качестве раствора-подавителя катионов находит гидроксид тетрабутиламмония. На рис. 2.27 показан принцип действия подавительной колонки. Когда кислота, например, HCl, попадает в неё, ионы хлорида диффундируют в направлении более низкой концентрации хлорида (т.е., сквозь мембрану), а ионы гидроксида диффундируют в поток подвижной фазы. Здесь гидроксид реагирует с ионом водорода кислоты, в результате образуются молекулы воды, имеющей весьма низкую проводимость. Таким образом, общая проводимость подвижной фазы уменьшается. Благодаря этому достигается снижение фонового сигнала и улучшение предела обнаружения на порядок.

2.5.Г.6. Применение. Наиболее ярким примером применения ионообменной хроматографии было впервые осуществлённое разделение всех двадцати важнейших с биологической точки зрения α-аминокислот. Для разделения могут быть использованы как анионо-, так и катионообменники, в ходе опыта pH раствора должен быстро и ступенчато изменяться. Если используется катионообменное вещество, pH нужно последовательно повышать, если анионообменное – снижать. Поскольку среды с такими значениями pH весьма агрессивны, используют материалы на полимерной основе.

Для многих может показаться неожиданным, но моносахариды, олигосахариды и полисахариды проявляют слабые кислотные свойства, соответствующие значения pK_a находятся в пределах от 12 до 14. Соответственно, в сильноосновной среде (например, 0,1-молярном или более высокой концентрации растворе NaOH) эти соединения легко разделить с помощью ионобменной хроматографии. В этом случае используют анионообменники, также на полимерной основе. С помощью анионообменных смол можно также анализировать анионы, отличающиеся степенью окисления (например, фосфиты, фосфаты и пирофосфаты либо сульфиты и сульфаты).

Разделению поддаются не только катионы различных металлов (например, щелочных и щёлочноземельных), но и ионы одного и того же металла с разной степенью окисления. В этих случаях весьма эффективно использование катионообменников на силикагелевой основе.

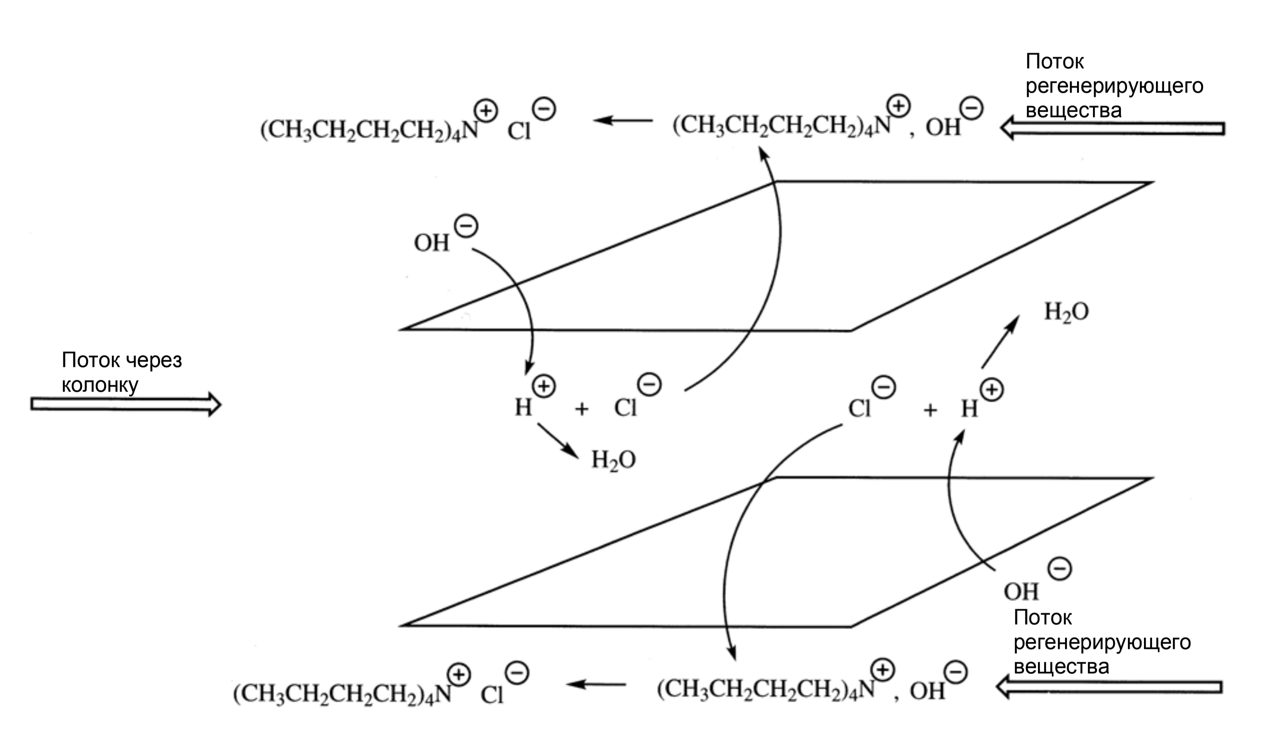


Рис. 2.27. Функционирование колонки-подавителя. Пояснения см. по тексту.

Ионообменная хроматография – один из лучших методов разделения и анализа ионогенных соединений. В сочетании с кондуктометрическим детектором и подавительной колонкой данный метод позволяет достичь пределов обнаружения, значительно более низких, чем другие методы. Недостатки метода определяются тем же, что и его преимущества: он пригоден только для соединений с ионной связью или могут диссоциировать в растворах с образованием ионов.

Кроме того, использование солей и буферных растворов высокой концентрации влечёт за собой увеличение трудозатрат по техническому обслуживанию насосной и детекторной систем, поскольку осаждение солей на кювете детектора, колонке, соединительных трубопроводах, инжекторе и головке насоса могут привести к серьёзным нарушениям работы установки.

2.5.Д. Аффинная хроматография

Описанные выше варианты хроматографического разделения не позволяют разделить, определить количество или очистить ингредиенты сложных природных матриц (например, ферменты и субстраты, антитела, сахара). К счастью, за миллионы лет природа создала сотни высокоселективных, а то и специфичных, систем взаимодействия между центрами связей и лигандами. Высокая селективность обусловлена тем, что успешное распознавание лиганда центром связи по природе трёхмерно и зачастую представляет собой сочетание параллельно протекающих полярных, неполярных, ионных взаимодействий и взаимодействий с водородными связями.

Аффинная хроматография (хроматография по сродству) использует эти высокоселективные взаимодействия путём прививания одного из компонентов к поверхности сорбента. Последовательность разделения обычно состоит из четырёх этапов: (1) загрузка пробы в колонку; (2) вымывание невзаимодействующего вещества из колонки; (3) отрыв анализируемого вещества от поверхности; (4) повторное уравновешивание колонки.

Первые два этапа напоминают этапы, присущие многим методам, основанным на применении сорбента (например, твердофазному экстрагированию), когда анализируемое вещество удерживается сорбентом, а вещества, не представляющие интереса в опыте, вымываются. Знаком и этап 3 – элюирование вещества, вот только в данном случае большинство обычных растворителей элюирования не обеспечивают. Сильные органические растворители несовместимы с большинством материалов аффинной хроматографии на основе ферментов, поскольку ферменты в таких растворителях денатурируются. Процесс денатурации зачастую необратим. Следователь-

но, на этапе элюирования нужно применять конкурирующий лиганд или не вызывающий денатурации *высвобождающий реагент*, например, мочевину в малых концентрациях. Четвёртый этап такой же, как в любом из градиентных методов ВЭЖХ. Прежде чем проводить следующий опыт, хроматографическую установку нужно привести в исходное состояние (т.е. повторно уравновесить).

Применяя аффинную хроматографию необходимо учитывать то, что не требовалось учитывать в других рассмотренных выше способах хроматографии, а именно, ориентацию привитой фазы по отношению к поверхности основы. Как сказано выше, высокая селективность почти всегда обусловлена уникальным трёхмерным взаимодействием. Чтобы соответствующие центры не только были физически доступны для анализируемого вещества, но и, что крайне важно, сохраняли свою трёхмерную структуру, существенно, как именно протекает процесс прививания.

В аффинной хроматографии прививание, как правило, требует, чтобы вначале к поверхности прививалась своего рода «ножка» которая дистанцировала бы реакционный центр от поверхности. Такие «ножки» обычно представляют собой линейные молекулы и содержат (или обладать возможностью образовывать) на своем конце функциональные группы, способные к дальнейшим химическим взаимодействиям. Примером таких групп могут служить *н*-алкилдиамины. Эти «ножки» также должны иметь небольшую длину, чтобы исключить любые неспецифические взаимодействия. К преимуществам аффинной хроматографии с точки зрения химика-аналитика относятся:

1. Гораздо бóльшие скорость и эффективность разделения, чем в традиционных способах.
2. Возможность разделять и детектировать пробы значительно меньших объёмов.

Данный способ отличают также следующие недостатки.

1. Колонки имеют весьма высокую стоимость, зачастую требуют особых условий хранения (например, в холодильнике), подвержены необратимым повреждениям.
2. Хроматографический анализ затрудняется медленной кинетикой десорбции.
3. Имеется весьма ограниченное количество материалов для основы сорбентов.

Любопытно, что как раз то из направлений аффинной хроматографии, в котором достигнуты наибольшие успехи, считается отдельным разделом. Это – хиральная хроматография.

2.5.E. Хиральная хроматография

Простейшее определение хиральности – это свойство молекулы существовать в двух или более пространственно несовместимых конфигурациях атомов. Для этого один из атомов, называемый хиральным центром, должен иметь разные функциональные группы в каждой позиции вокруг хирального центра. Хотя любой атом, отличающийся трёхмерной структурой связей, может вызвать хиральность, мы рассмотрим лишь пример, в котором хиральным центром является атом углерода. В случае пропранолола могут образовываться две структуры, являющиеся зеркальным отражением друг друга – так называемые энантиомеры (рис. 2.28). В химической номенклатуре они обозначаются *R* (правосторонняя) и *S* (левосторонняя).

R-пропранолол *S*-пропранолол

Рис. 2.28. Хиральность пропранолола: *R*- и *S*-энантиомеры.

В последние годы в фармацевтической промышленность значительно возросла важность разделения и количественного определения хиральных соединений. Во многих случаях эффективностью или терапевтическим эффектом обладает лишь один из набора энантиомеров лекарственного вещества. Соответственно, с точки зрения описания препарата важно их разделить.

Способ хиральной хроматографии основан на различии энергии взаимодействия между поверхностью с хиральной привитой фазой и каждого из энантиомеров определяемого вещества, взаимодействующего с ней. Поскольку молекулы анализируемых веществ отличает большое разнообразие

размеров и форм, был разработан целый ряд хиральных привитых фаз, способных по-разному реагировать на эти различия. При этом в основе различного взаимодействия энантиомеров с поверхностью хирального сорбента лежат самые разнообразные стерические и химические факторы – образование водородных связей, π-π-взаимодействие, способ разделения в зависимости от проникновения в хиральные полости, образование и разделение комплексных металлсодержащих соединений. Чтобы колонка обеспечивала максимальное различие по времени удерживания энантиомеров, сама поверхность набивки также должна быть выполнена из хиральных соединений высокой чистоты.

2.5.E.1. Колонки типа I (Пиркле). Материалы *типа Пиркле* представляют собой привитые фазы, состоящие из трёх компонентов: основа – силикагель, «ножка» или дистанцирующая часть, не обладающая хиральными свойствами, и хиральная привитая фаза высокой чистоты (рис. 2.29).

н-(3,5-динитробензоил)фенилглицин

Рис. 2.29. Структура привитой фазы типа Пиркле.

Такие носители применяются в хиральной хроматографии чаще всего, поскольку обеспечивают большую степень универсальности при разделении самых разнообразных по строению хиральных молекул. Действительно, чтобы добиться самой высокой специфичности по отношению к определяемому веществу, можно соответствующим образом подобрать взаимодействие (или ряд взаимодействий) указанного вещества с поверхностью. Далеко не полный перечень *классов* соединений, поддающихся разделению, включает спирты, амины, нафтолы, гидроксиловые кислоты, тиолы и карбоксиловые кислоты. Для этого класса материалов набивки разработаны сотни методик.

2.5.Е.2. Колонки типа II. Набивка этих колонок основана на полисахаридах – целлюлозе и амилозе. Первым был разработан материал на основе триацетата целлюлозы. Получение производных целлюлозы и амилозы позволило наладить промышленное производство примерно полутора десятков материалов набивки. Большинство из них получают путём осаждения на силикагеле. Так же, как для колонок типа Пиркле, разработаны сотни хроматографических методик. Главное ограничение применения таких материалов состоит в том, что при изменении подвижной фазы полимер может набухать или давать усадку.

2.5.Е.3. Колонки типа III (на циклодекстринах). Циклодекстрины (структуру которых иллюстрирует рис. 2.30) – это фаза, чаще всего используемая в данном способе разделения, которое основывается на способности анализируемого вещества проникать в полость. Иначе говоря, некоторая часть молекулы должна быть достаточно малой для этого. К веществам,

β-циклодекстрин

Рис. 2.30. Структура циклодекстрина

анализируемым на таких фазах, относятся, в частности, замещённые норникотины, гидантоины и барбиталы. Также эти фазы используются для разделения некоторых наборов изомеров (например, *о*-, *м*- и *п*-нитроанилина). Более новые фазы включают производные циклодекстрина, специально полученные с целью увеличения количества и повышения силы взаимодействий определяемого вещества с набивкой.

2.5.Е.4. Колонки типа IV. Точное определение способа типа IV – лигандообменная хроматография. Как следует из названия, разделению предшествует образование координационных соединений определяемыми веществами, которые должны содержать доноры электронов (азот, серу или кислород) и ионы металла (зачастую меди, цинка, никеля, кадмия). В качестве набивки могут использоваться модифицированные смолы или привитый силикагель. Наиболее широкое применение этот способ нашёл в разделении смесей рацемических аминокислот.

2.5.Е.5. Колонки типа V. Материалы для колонок этого типа представляют собой силикагелевую основу, к которой привит либо альбумин, выделенный из сыворотки коровьей крови, либо α-1-кислотный гликопротеин. Главным достоинством таких материалов является то, что они очень хорошо функционируют в водных растворах, главным недостатком – то, что они несовместимы с большинством органических растворителей и переносят лишь некоторые другие растворители (например, изопропиловый спирт в концентрации до 10 %). Поэтому данные материалы не нашли столь широкого применения, как остальные.

2.5.Ж. Эксклюзионная хроматография

В эксклюзионной хроматографии разделение осуществляется благодаря различным размерам молекул анализируемых веществ. Чтобы при этом достигалась воспроизводимость, должны быть выполнены два условия.

1. Сорбент должен иметь строго определённое распределение размеров пор.
2. Анализируемые вещества не должны химически взаимодействовать с поверхностью сорбента (т.е. время удерживания определяемого вещества должно определяться исключительно проникновением (инклюзией) или непроникновением (эксклюзией) в поры).

В эксклюзионной хроматографии используются материалы набивки двух типов. К первому принадлежат жёсткие неорганические материалы, например, силикагель. Ко второму – органические полимеры, например, полистиролдивинилбензол или полидивинилбензол.

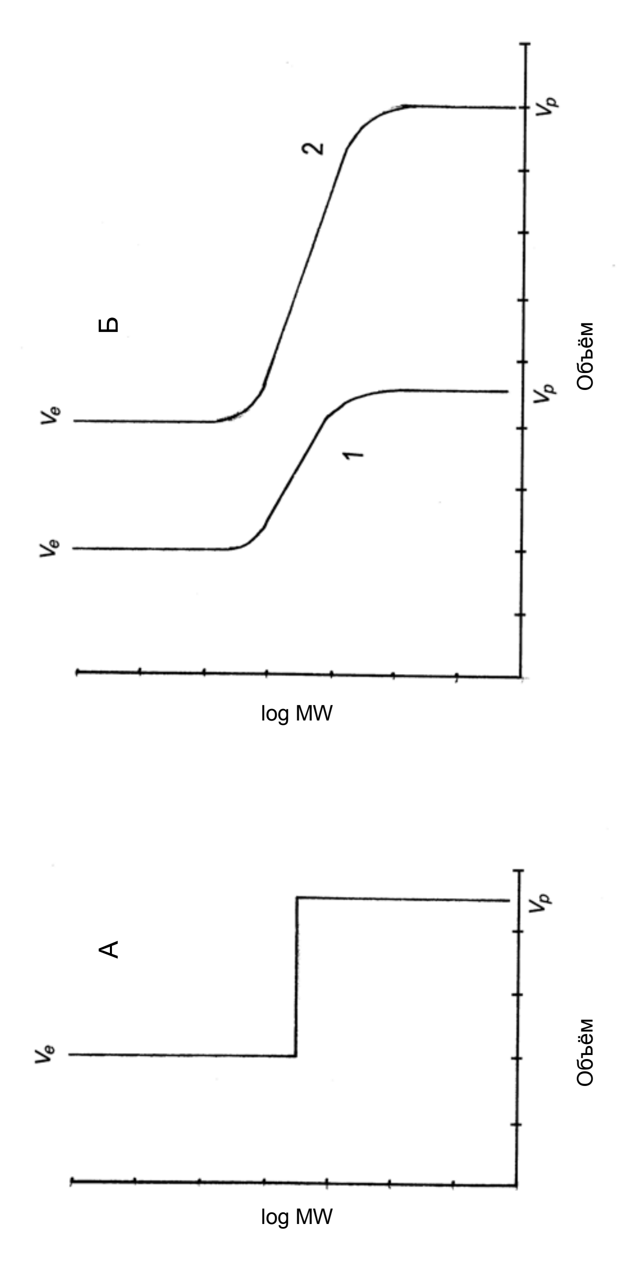


Рис. 2.31. Зависимость между удерживаемым объёмом и логарифмом молекулярной массы. (А) Все поры одного размера. (Б) Влияние распределения размера пор (1) и наличия нескольких колонок (2) с одинаковым распределением размера пор. Разрешение MW в одном и том же её диапазоне возрастает. Следует обратить внимание на то, что при этом как объём эксклюзии, так и объём проникания складываются

Хотя общее название данного способа – «эксклюзионная хроматография», при использовании органических материалов иногда применяют термины «гель-проникающая хроматография» (обычно при использовании органической подвижной фазы при низком или высоком давлении) или «гель-фильтрационная хроматография» (чаще всего при использовании водорастворённой подвижной фазы при низком давлении), чтобы отличить этот вариант от того, где используются неорганические материалы. В последнее время термины «гель-проникающая хроматография» и «гель-фильтрационная хроматография» выходят из употребления, поскольку промышленность освоила производство материалов на силикагелевой основе и особых органических полимерных материалов, совместимых с водорастворённой подвижной фазой.

2.5.Ж.1. Калибровочные кривые в эксклюзионной хроматографии. В традиционном хроматографическом опыте обычно удаётся идентифицировать анализируемое вещество (по времени удерживания пика) и определить его количественное содержание (по площади пика). Эксклюзионная хроматография продвинулась ещё на шаг. Главная задача этого способа состоит в том, чтобы определить распределение пробы по молекулярной массе или разделить определяемые вещества по размеру молекул.

Чтобы понять, как эта цель достигается, рассмотрим построение калибровочной кривой в применяемых в эксклюзионной хроматографии координатах логарифма молекулярной массы (lg MW) и объёма (V). При этом три условия опыта будем считать идеальными. Во-первых, будем полагать, что проба состоит из одинаковых молекул сферической формы с известными молекулярной массой MW и диаметром x. Во-вторых, будем считать, что колонка набита идеально материалом с одинаковым зернением и размерами пор y. В-третьих, примем, что взаимодействие между поверхностью и молекулами пробы полностью отсутствует, молекулы лишь могут проникать или не проникать в поры.

Если $x > y$, молекулы анализируемых веществ, независимо от их молекулярной массы, не проникают в поры и элюируются из колонки с одним и тем же удерживаемым объёмом V_e, равным объёму подвижной фазы между частицами материала набивки и называемым объёмом полной эксклюзии. Поскольку анализируемые вещества не попадают в поры, объём V_e будет наименьшим возможным для системы.

Если же $x < y$, молекулы анализируемых веществ могут проникать во все поры, весь объём пор набивки в колонке становится доступным. Общий объём обозначается V_p и называется объёмом полного проникания. Это – наибольший удерживаемый объём колонки. Все вещества с молекулами

меньшей массы будет характеризовать это же значение удерживаемого объёма. Калибровочная кривая в координатах lg MW и V показана на рис. 2.31 А. На такой колонке нельзя разделить вещества с молекулярной массой больше некоторого MW или меньше некоторого MW, да и при этих пограничных значениях молекулярной массы использование такой колонки проблематично.

К счастью, никакая хроматографическая система не является идеальной. Иными словами, материал набивки колонки для эксклюзионной хроматографии характеризуется некоторым распределением размера пор вокруг номинального. Посмотрим теперь, как осуществляется разделение в реальных условиях. В пробе имеются вещества, различающиеся по молекулярной массе (и размеру молекул), поры набивки также имеют разные размеры. При этом по-прежнему предполагается, что какое бы то ни было взаимодействие между молекулами анализируемых веществ и набивки отсутствует.

Теперь можно видеть, что, благодаря распределению размеров пор, некоторая часть их объёма оказывается доступной для разделяемых веществ, причём часть эта тем меньше, чем больше размер молекулы соответствующего вещества. Это означает, что элюируемый объём молекул большего размера будет больше, чем V_e, начиная с некоторой молекулярной массы, называемой *пределом эксклюзии*. Поскольку имеются поры с диаметром меньше среднего, можно разделить вещества, размеры молекул которых существенно меньше, чем в первом идеализированном примере. Соответственно, и точка V_p, в которой lg MW пересекает ось V, будет значительно ниже. Кривая, соединяющая указанные пределы, и будет калибровочной кривой селективного проникновения в зависимости от молекулярной массы (кривая 1 на рис. 2.31 Б).

Здесь следует принимать во внимание несколько важных моментов. Во-первых, заметим, что рабочий объём ($V_e - V_p$) колонки длиной 30 см диаметром 7,5 мм обычно довольно мал, как правило, от 5 до 7 мл. Соответственно, можно разделить лишь небольшое количество пиков. Чтобы устранить этот недостаток, зачастую несколько колонок соединяют последовательно в так называемый *каскад*. В каскад могут собираться колонки как с одинаковыми, так и с различными размерами пор. Выбор диктует диапазон молекулярных масс веществ, которые надлежит разделить. Чем шире этот диапазон, тем шире нужен диапазон размеров пор.

Как влияет каскадное соединение нескольких колонок с одним и тем же размером пор на зависимость lg MW от V? Это показано на рис. 2.31 Б, кривая 2. Обратите внимание, что ни предел эксклюзии, ни предел проник-

новения в терминах MW не изменились. Общий же рабочий объём системы возрастает во столько раз, сколько колонок одного и того же объёма соединены. Не изменяются также и пределы MW, заданные исходными значениями V_e и V_p. Действительно, ведь распределение объёмов пор одно и то же во всех колонках. Итак, рабочий объём, равный 6 мл для одной колонки, будет равен 12 мл для двух, 18 мл – для трёх колонок и т.д.

Если строгое разрешение по молекулярной массе не требуется, а нужно разделить вещества, значительно различающиеся по молекулярной массе, целесообразно использовать каскад колонок не с одним и тем же, а с разными размерами пор. Хотя фирмы-изготовители колонок дают противоречивые рекомендации, лучше всего подбирать колонки так, чтобы объём полного проникания колонки с большим размером пор был как можно ближе к объёму полной эксклюзии колонки с меньшим размером пор. В этом случае будет получена плавная зависимость lg MW от V, как показано на рис. 2.32.

Можно привести эмпирическое правило грубой оценки зависимости рабочего диапазона молекулярных масс в гель-проникающей хроматографии от диаметра пор: 1/40 диаметра пор в ангстремах < MW < 40 диаметров пор. К примеру, при диаметре пор 10 000 Å рабочий диапазон молекулярных масс будет примерно от 250 до 40 000. Ещё раз отметим, что до начала работы следует изучить фактические рабочие зависимости, полученные от изготовителя.

Независим от того, какой выбран материал, до начала работы нужно построить калибровочную кривую для колонки. Действительно, ранее мы предположили, что молекулы имеют идеальную сферическую форму, но это зачастую не так. Следовательно, в хроматографическую установку нужно ввести некое стандартное вещество, молекулы которого имеют форму, сходную с формой молекул определяемого вещества, и построить калибровочную кривую. Это необходимо проделывать всякий раз до начала использования нового каскада колонок.

2.5.Ж.2. Нахождение распределения молекулярных масс. Эксклюзионная хроматография достаточно редко используется для исследования веществ с малой молекулярной массой, поскольку для них, как правило, более эффективны традиционные нормально-фазный и обращённо-фазный варианты ВЭЖХ. Однако эксклюзионный способ весьма полезен, если исследованию подлежат высокомолекулярные вещества, особенно полимеры – полистирол, асфальтен, меламин, полиэтиленгликоль. Характеристика полимера как готового изделия зачастую включает один или более из числа показателей: среднее массовое число M_n, средняя молекулярная масса

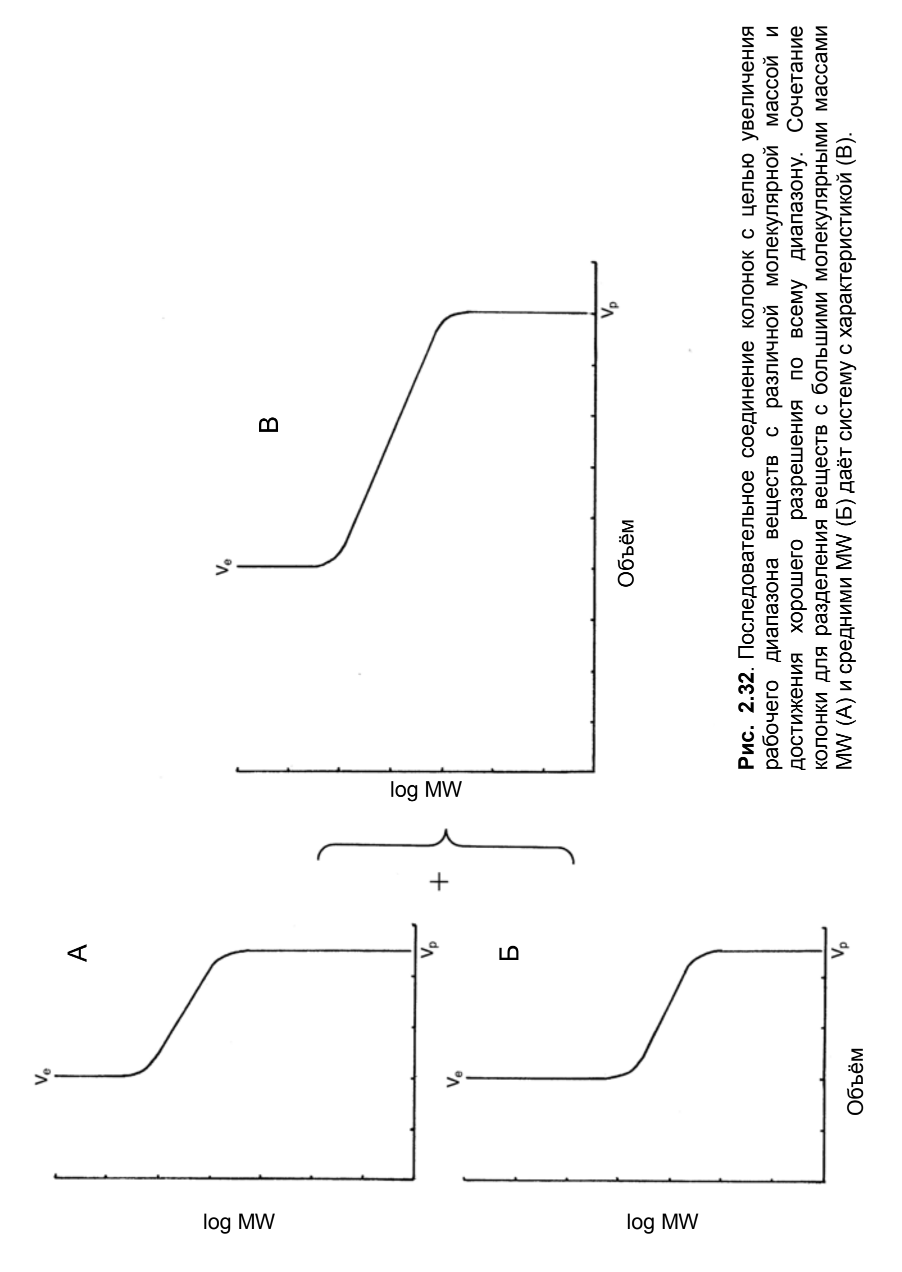


Рис. 2.32. Последовательное соединение колонок с целью увеличения рабочего диапазона веществ с различной молекулярной массой и достижения хорошего разрешения по всему диапазону. Сочетание колонки для разделения веществ с большими молекулярными массами MW (А) и средними MW (Б) даёт систему с характеристикой (В).

M_w, M_z и дисперсия M_w/M_n Эти показатели могут быть рассчитаны по калибровочной кривой, времени выхода и форме пика следующим образом:

$$M_n = \sum N_i M_i \Big/ \sum N_i$$

$$M_w = \sum N_i M_i^2 \Big/ \sum N_i M_i$$

$$M_z = \sum N_i M_i^3 \Big/ \sum N_i M_i^2$$

В приведенных уравнениях N_i – количество молекул i, имеющих молекулярную массу M_i, Σ – знак суммирования по всем молекулам пробы.

Проба полимера, в которой все молекулы имеют равную молекулярную массу, называется *монодисперсной*, дисперсность в ней равна 1,0.

2.5.Ж.3. Применение гель-проникающей хроматографии. Освоение производства огромного количества полимеров и сополимеров вызвало к жизни необходимость адекватно их характеризовать. Залог успеха при анализе таких веществ – полностью растворить пробу в растворителе настолько сильном, чтобы анализируемые вещества оставались в растворе на протяжении всего опыта и не взаимодействовали с поверхностью сорбента.

Для веществ со сравнительно небольшой молекулярной массой, от неполярных до слабополярных, в качестве подвижной фазы часто используют тетрагидрофуран (ТГФ) и толуол. К таким веществам относятся полистирол, полибутадиен, полиметилметакрилат, нитрат целлюлозы и ацетат амилозы. Если в качестве подвижной фазы используется ТГФ, со стабилизатором (ВНТ), чтобы не допустить образования перекисей, разрушающих полимерный сорбент. Анализ зачастую проводят при комнатной температуре.

С другой стороны, чтобы высокомолекулярные полиэтилен, полистирол, нейлон были полностью растворены, требуются растворители, устойчивые к высоким температурам. Этому условию удовлетворяют ортодихлорбензол, 1,2,4-трихлорбензол и гептафторизопропиловый спирт. Полученные растворы выдерживают температуру до 135 ºС. При такой температуре пробоподготовка, работа с пробами, ввод проб и анализ предъявляют повышенные требования как к хроматографу, так и к экспериментатору.

Для работы в таких агрессивных условиях выпускаются специальные насосы, инжекторы и детекторы.

Для работы с полимерами имеющих средние показатели по молекулярной массе, такие как меламин, асфальтен, полиуретан – используется множество разных растворителей, в частности, диметилформамид, диметилацетамид, хлороформ.

2.5.Ж.4. Детекторы для эксклюзионной хроматографии. Чаще всего для эксклюзионной хроматографии используют рефрактометрические детекторы. Но почему? Ведь рефрактометры не отличаются ни наибольшей чувствительностью, ни наименьшим пределом детектирования. Однако им присущи два замечательных свойства. Во-первых, рефрактометр *универсален*, поскольку всё, что нужно, чтобы появился сигнал детектора, – это наличие разницы в коэффициентах преломления элюента и анализируемого вещества. Поэтому для рефрактометра вполне пригодны растворители, с которыми не работают спектрофотометрические детекторы ультрафиолетового и видимого диапазонов из-за того, что спектр поглощения этих растворителей также лежит в ультрафиолете. Во-вторых, рефрактометрические детекторы выдерживают очень высокие температуры, необходимые для анализа высокомолекулярных труднорастворимых полимеров. Именно эти две особенности делают рефрактометры незаменимыми для анализа полимеров с высокой молекулярной массой.

Поскольку в качестве подвижной фазы могут быть использованы весьма разнообразные вещества, диапазон фоновых сигналов рефрактометров крайне широк. При этом, если коэффициент преломления растворённого вещества больше или меньше, чем коэффициент преломления элюента, пики хроматограммы будут, соответственно, положительными или отрицательными, как показано на рис. 2.33.

Кроме того, большими потенциальными возможностями для гель-проникающей хроматографии обладает испарительный нефелометрический детектор (ИНД). Его принцип действия основан на том, что лазерный луч рассеивается при попадании в него частиц. По положению и интенсивности рассеянного луча судят о концентрации частиц в пробе.

Для эффективной работы нефелометра бóльшую часть подвижной фазы нужно испарить, чтобы сконцентрировать определяемое вещество. При этом само вещество должно быть нелетучим или низколетучим, чтобы и оно, в свою очередь, не испарилось. Соответственно, с нефелометром могут использоваться только высоколетучие растворители (толуол, ТГФ, хлороформ и т.п.).

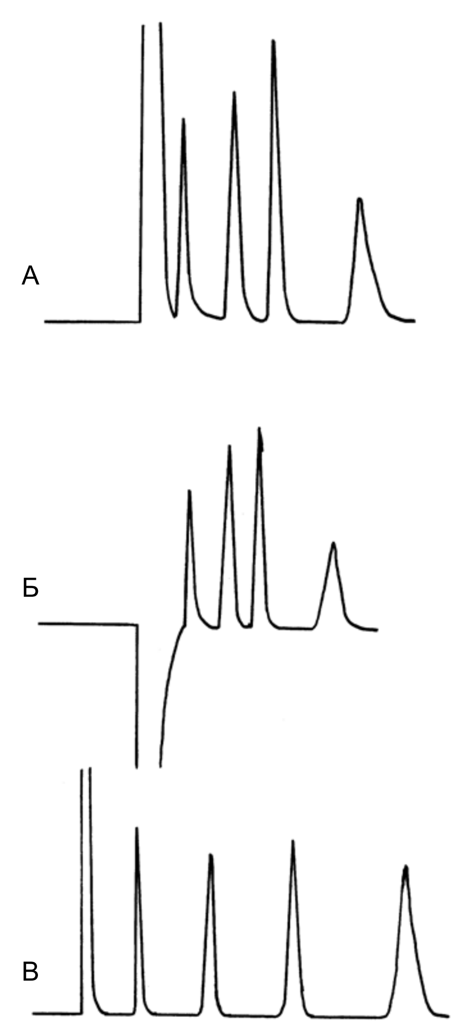


Рис. 2.33. Хроматограммы при разделении рибозы, глюкозы, сахарозы и лактозы на колонках с привитой аминофазой. (А) Подвижная фаза: смесь ацетона с водой, объёмные доли 80:20, колонка 25 см. Примечание: показано исключительно в иллюстративных целях. Применение ацетона *не рекомендуется*, поскольку он вступает в реакцию с первичными аминами привитой фазы. (Б) Подвижная фаза: смесь 1,2-диметоксиэтана с водой, объёмные доли 77,5:22,5, колонка 25 см. (В) Подвижная фаза: смесь ацетонитрила с водой, объёмные доли 75:25, колонка 15 см. Сахара растворены в воде, на всех хроматограммах первым элюируется пик воды.

2.5.Ж.5. Применение эксклюзионной хроматографии. Чаще всего в настоящее время эксклюзионную хроматографию используют для анализа полимерных соединений, как синтетических (нейлон), так и природных (биополимеры). Гель-проникающая хроматография по-прежнему остаётся предпочтительным способом анализа синтетических полимеров, поскольку с её помощью удаётся быстро получить информацию о молекулярной массе, которую другие способы ВЭЖХ не позволяют получить столь же эффективно. Что же касается высокополярных веществ и биополимеров, то даже освоение промышленного производства колонок, совместимых с водными растворами, не сделало и вряд ли когда-нибудь сделает гель-проникающую хроматографию главным способом разделения. Дело в том, что для этого разработаны и прошли испытание практикой много других способов ВЭЖХ (на обращённо-фазных сорбентах с большим размером пор), ряд из которых, к тому же, обладают высокой специфичностью (аффинная хроматография).

ЛИТЕРАТУРА

1. *United States Pharmacopeia XXIII,* The United States Pharmacopaeial Convention, Rockville, MD, 1995, Section 621 (*XXIII Фармакопея США*. Изд. Фармакопейного комитета США).

2. B.L. Karger, L.R. Snyder, and Cs. Horvath, *An Introduction to Separation Science,* John Wiley & Sons, New York, 1973, pp. 25-33 (Карджер Б., Снайдер Л., Хорват Ч. *Введение в учение о разделении*).

3. J. H. Knox, *High Performance Liquid Chromatography,* Edinburgh University Press, 1978, pp. 5-19 (Нокс Дж. *Высокоэффективная жидкостная хроматография*).

4. S. G. Weber and P. W. Carr, in *High Performance Liquid Chromatography,* P. R. Brown and R. A. Hartwick (eds.), John Wiley & Sons, New York, 1989, pp. 8-10, 52-54 (*Высокоэффективная жидкостная хроматография*. Под ред. П. Брауна и Р. Хартвика).

5. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography,* 2nd edition, John Wiley & Sons, 1994, pp. 127-135 (Мейер В. *Практика высокоэффективной жидкостной хроматографии*).

6. L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* **92,** 223 (1974).

7. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography,* 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994, pp. 135-137, 149-150 (Мейер В. *Практика высокоэффективной жидкостной хроматографии*).

8. S. N. Deming and M. L. H. Turoff, Anal. Chem. 50, 546 (1978).

9. M. E. Swartz and I. S. Krull, Analytical Method Development and Validation, Marcel Dekker, New York, 1997 (Суорц М., Кралл И. *Разработка и валидация аналитических методик*).

3

ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ВЭЖХ

Профессиональный набор инструментов

Когда вызывают механика, электрика или сантехника, чтобы найти и устранить неисправность в автомобиле, проводке или электроприборе, кране или раковине, они приносят с собой набор инструментов и запчастей. Кроме того, когда за дело берётся новичок, он наблюдает за более опытными мастерами или то и дело заглядывает в справочники и инструкции, чтобы как следует выполнить работу. Примерно так же, чтобы эффективно обнаруживать отклонения от нормальной работы в установках для ВЭЖХ, устранять эти отклонения и проводить техническое обслуживание, хроматографисту нужны не только документация, умение диагностировать и опыт, но и набор нужных инструментов и определённое количество запасных частей.

В действительности предугадать, что понадобится рожковый ключ на четверть дюйма и трубка определённых диаметра и длины, может помочь разве что озарение. Похоже, что инструменты и запчасти испаряются быстрее, чем пентан! Ниже мы приводим перечень наиболее востребованных инструментов и расходных материалов. Когда они есть, девять раз из десяти можно привести в порядок жидкостной хроматограф, если дело касается насоса, колонки и соединительных трубопроводов. В скобках указаны количества инструментов, принадлежностей и запасных частей соответствующих типоразмеров.

Ключи гаечные *рожковые двусторонние*: 1/4 – 3/8 дюйма (2), 1/4 – 5/16 дюйма (2), 1/2 – 9/16 дюйма (2), 5/8 – 7/16 дюйма (2); *разводные*: 15 см (2), 30 см (1).

Отвёртки *прямая и крестообразная*: № 1 (по 1), № 2 (по 1), № 3 (по 1); *часовые* в наборе (1); *угловые* прямая и крестообразная (по 1). По возможности, с антимагнитными наконечниками.

Острогубцы (2), ***пассатижи*** (2), ***плоскогубцы с зажимом*** (1).

Зубочистки: угловая (1), дуговая (1), прямая.

Зеркало: малое (около 2,5 см), поворотное на телескопической рукоятке.

Фонарики электрические: заливающего освещения и точечного освещения (по 1).

Ключи гаечные универсальные: полный набор от 1/32 до 3/8 дюйма (1).

Пинцеты: прямой (1), угловой (1); с зажимом (1).

Надфиль: трёхгранный, 15 см.

Молоток (1).

Ножи: перочинный многолезвийный (1); резак (1).

Кроме этого, необходимы шприцы [например, стеклянный на 10 мл с переходником на люэровский наконечник (1), стеклянный на 10 мл с наконечником-переходником на трубопровод 1/16 дюйма (1), туберкулиновые Люэра на 3 мл, 5 мл, 10 мл и 30 мл (по 2)], разнообразные мензурки и колбы Эрленмейера, типовые химические реактивы и растворители. Если предполагается промывка элементов установки растворителем, целесообразно предусмотреть ультразвуковую баню.

В лаборатории должен быть централизованный склад, где хранятся наборы запасных частей для каждого прибора. Требования к номенклатуре и количеству запасных частей и принадлежностей (ЗИП) обычно приведены в инструкциях по эксплуатации. Многие изготовители хроматографов продают наборы ЗИП для типовых соединений, фитингов и трубопроводов. Наборы ЗИП, как для конкретных приборов, так и типовые, формировались на основании многолетнего опыта хроматографистов. Поэтому рекомендуем приобретать приборы, полностью укомплектованные ЗИП, а также типовые наборы запчастей в полном необходимом количестве. Такие наборы обычно включают:

Трубопроводы: 1/16 дюйма, нержавеющая сталь (набор с внутренними диаметрами от 0,18 до 0,5 мм) либо торцованные и шлифованные, либо не торцованные; 1/8 дюйма, политетрафторэтилен, отрезки по 1 м; 1/16 дюйма, полиэфирэфиркетон (если используется).

Гайки накидные и втулки обжимные: наборы из нержавеющей стали для данного типоразмера соединений, например, фирм Уотерс, Реодайн, Эс-эс-ай, Паркер (по 5 наборов); из полиэфирэфиркетона (ПЭЭК) под затяжку вручную (по 10 каждого вида).

Муфты с нулевым мёртвым объёмом: для трубопроводов 1/16 дюйма (4).

Муфты низкого давления: по две для каждого типоразмера соединений.

Фильтры входные: один сменный фильтр для каждого резервуара.

(Заметим, что ряд фирм-изготовителей хроматографов поставляют комплекты, в которые входит множество разных трубопроводов, гаек, обжимных втулок и муфт. Это целесообразно только при условии, что по мере расходования этих деталей их докупают).

Труборез: для нержавеющей стали (1), для ПЭЭК (1).

Фритты: для фильтров встраиваемых в трубопроводы (одна запасная на фильтр в сборе); для колонок (4).

Не забудьте также приобрести:

Защитные колонки: по меньшей мере, одну на каждый тип колонок в установке (если их использование предусмотрено).

Аналитическую колонку: по меньшей мере, одну запасную (для часто проводимых анализов).

Введение. Обеспечение штатного режима ВЭЖХ

Возможны два подхода к поддержанию штатного режима работы хроматографа для ВЭЖХ. Первый, важнейший, предусматривает профилактику каких бы то ни было отклонений и называется *регламентными профилактическими работами*.

Регламентные профилактические работы – это программа плановых мероприятий, направленных на поддержание параметров прибора в нормальных и приемлемых для работы пределах. Не следует рассматривать регламентные профилактические работы, как страховку от поломок на все случаи жизни – страховка вступает в действие, когда что-то из ряда вон выходящее всё-таки случается. В этом смысле на страхование, скорее, похожи договоры на обслуживание приборов. Регламентные профилактические работы необходимы, чтобы этого избежать. На постоянной основе осуществляются проверка, текущий контроль и техническое обслуживание прибора, чтобы предотвратить значительные неисправности, устранение которых – трудоёмкий и дорогостоящий процесс. В конце концов, прибор по определению выходит из строя в самый неподходящий момент – во время работы. В таблице 3.5 в конце данной главы приведен примерный график регламентных профилактических работ для основных компонентов системы ВЭЖХ.

Хотя цель регламентных профилактических работ состоит в том, чтобы полностью исключить возможность выхода хроматографа из строя, эта цель не достигается никогда. Во многих случаях имеют место нештатные ситуации, которые хроматографист не мог предусмотреть или предотвратить. В подобных случаях параметры системы выходят за пределы уста-

новленных, результаты утрачивают воспроизводимость, хроматограф просто ведёт себя нехарактерным образом. Тогда специалист должен оценить обстановку, выявить причину нарушения нормального режима и устранить неисправность – как правило, в напряжённых условиях жёстких ограничений по времени.

Один из наиболее эффективных и действенных подходов к нештатным ситуациям заключается в том, чтобы разделить хроматографическую систему для ВЭЖХ на дискретные части. Занимаясь такими частями строго по одной, мы достигаем одновременно двух целей. Во-первых, обеспечивается системный и исключающий подход к задаче. Во-вторых, хроматографист получает возможность оценивать показатели каждого из компонентов отдельно.

Разделы этой главы примерно соответствуют группам компонентов системы, как показано в таблице 3.1. В каждом разделе соответствующая группа описана покомпонентно. Затем для отдельных компонентов рассмотрен порядок надлежащего использования, ухода, хранения, обслуживания, а также график регламентных профилактических работ.

Таблица 3.1.

Группы компонентов

Раздел	Тема	Шифр
3.1	Растворители и их свойства	РС
3.2	Подготовка растворителя и подвижной фазы	РП
3.3	Резервуары	Р
3.4	Входные фильтры и дегазаторы	ВФ
3.5	Блок насосов	Н
3.6	Предколонки и проходные фильтры	ПФ
3.7	Пробы и стандарты: подготовка и хранение	ПС
3.8	Инжекторы	И
3.9	Колонки	К
3.10	Соединительные трубопроводы	Т
3.11	Детекторы	Д

Последовательность рассмотрения компонентов хроматографа в данной главе повторяет тракт прохождения элюента. Глава начинается с рассмотрения свойств растворителей и порядка их подготовки к использованию, а заканчивается детекторами. Сюда включён также раздел о пробоподготовке

– не потому, что проба является частью установки для ВЭЖХ, а потому, что неверные действия при пробоподготовке могут привести к нештатным ситуациям, которые невозможно устранить, меняя что-то только в хроматографе. Следовательно, чтобы избежать ошибок в ВЭЖХ, нужно внимательно относиться к пробоподготовке и тщательно протоколировать все действия.

Раздел начинается с фундаментального и подробного рассмотрения компонентов, их использования и функций. После этого описывается ряд нештатных ситуаций и возможных причин ошибок – каждая по отдельности – и подробно обсуждаются меры устранения неисправности. Нештатным ситуациям присвоены буквенно-числовые шифры, с целью упрощения поиска по алфавитно-предметному указателю. К примеру, нештатная ситуация «Осаждение загрязнений на входном фильтре» имеет шифр «ВФ1». В указателе соответствующая ссылка имеет вид: «Фильтр, входной, загрязнение, ВФ1».

3.1. Растворители и элюенты

Растворители играют важнейшую роль в процессе разделения. Уточним, что под «растворителем» понимается чистое вещество, приобретаемое у изготовителя. Жидкости, которые помещаются в резервуары хроматографа перед введением в прибор, не имеет значения, являются ли они чистыми растворителями или состоят из нескольких компонентов, называются «элюентами». Жидкость, которая готовится при смешивании из элюентов помещенных в разные резервуары хроматографа и прокачивается через колонку ВЭЖХ, называется подвижной фазой или также «элюентом». Та жидкость, которая выходит из колонки для ВЭЖХ, называется «элюатом». Время удерживания при анализе зависит главным образом от состава элюента. Хотя то же самое можно сказать и о колонке, колонку не меняют всякий раз, когда нужно повлиять на время удерживания. Тому есть три причины. Во-первых, колонки, как правило, стоят дорого, так что держать большой запас невозможно или нецелесообразно. Во-вторых, замена колонки и её уравновешивание – процесс относительно трудоёмкий. Наконец, колонки нельзя менять столь же систематически, как элюенты. Это особенно ясно, когда речь идёт о градиентном режиме разделения. Поэтому вполне очевидно, что именно изменение состава элюента является самым очевидным путем оптимизации разделения.

В общем, хроматографическое удерживание веществ изменяется наиболее сильно, когда существенно изменяются абсолютное содержание составляющих компонентов подвижной фазы (элюента). Например, при

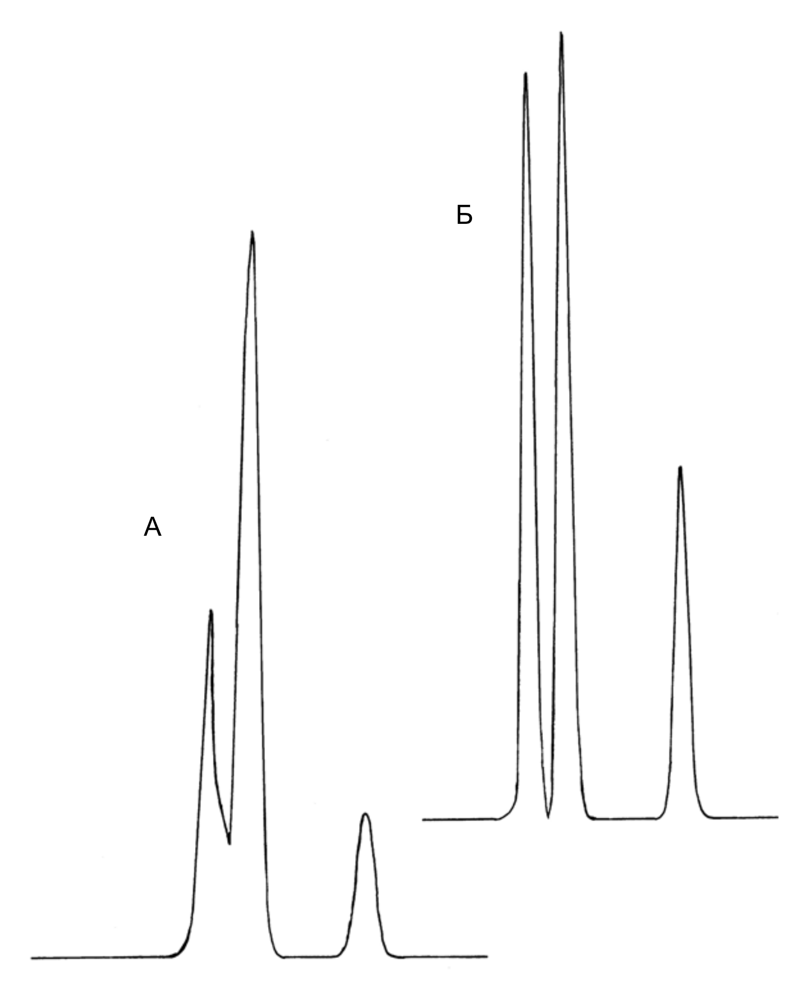


Рис. 3.1. Хроматограммы азобензола (первый пик) и двух других веществ, применяемых для защиты от солнечных лучей. (А) В состав подвижной фазы входят вода, метанол и ацетонитрил. (Б) Подвижная фаза та же, что в (А), но с добавкой 5 % ТГФ и 2 % ТФК.

использовании в качестве элюента смеси ацетонитрила с водой в равных объёмных долях на колонке C_{18} будут получены существенно меньшие времена удерживания, чем при использовании той же смеси в соотношении 40:60. Это свойство элюента вполне понятно. Тем не менее, зачастую забывают о том, что за счёт изменения состава подвижной фазы можно добиться

также улучшения селективности и специфичности разделения. Это улучшение может определяться несколькими факторами. Во-первых, компоненты элюента могут связываться с анализируемым веществом, таким образом, что усиливается его взаимодействие с поверхностью (как, например, в классической ион-парной хроматографии, см. раздел 2.5 В). Во-вторых, компоненты подвижной фазы могут связываться с анализируемым веществом, сводя к минимуму или вообще предотвращая образование связей с поверхностью, как, например, в случае такого взаимодействия при помощи водородных связей между первичными аминами и остаточными силанольными группами поверхности. Такие взаимодействия называются силанофильными и приводят к сильному удлинению ниспадающей части (среза) пика – образованию «хвоста». В-третьих, подвижную фазу можно использовать, чтобы удерживать анализируемое вещество в одной конфигурации. К примеру, рис. 3.1 А иллюстрирует значительное удлинение среза пика анализируемого вещества, элюируемого первым. Это вещество – авобензон, соединение, отличающееся кето-энольным таутомерным равновесием. Именно это равновесие в сочетании со свойством этой функциональной группы образовывать водородные связи (что приводит впоследствии к силанофильному взаимодействию с поверхностью) и приводит к столь сильному удлинению ниспадающей части пика. Добавляя к подвижной фазе трифторуксусную кислоту (ТФК) и тетрагидрофуран (ТГФ), можно добиться другой формы пиков на хроматограмме, показанной на рис. 3.1 Б. ТФК «фиксирует» молекулярное равновесие, а ТГФ действует как «поглотитель» силанольных групп на поверхности, что способствует минимизации взаимодействия определяемого вещества с этими группами.

Ко всему сказанному можно добавить, что при подобранных условиях разделения подвижная фаза всё равно остаётся наиболее часто сменяемым компонентом хроматографа. Это является очевидным, поскольку система, работающая в течение дня при расходе 1 мл/мин, потребляет около 1,5 л элюента. Поэтому, чтобы эффективно устранять неисправности или предотвращать их, следует хорошо понимать, как устроен хроматограф, каковы основные свойства растворителей, использованных для приготовления подвижной фазы, и как это влияет на результаты хроматографического опыта.

В самом общем виде можно считать, что элюент состоит из трёх частей: основные составляющие (объёмная доля свыше 5 %), вспомогательные составляющие (менее 5 %) и модификаторы (объёмная или массовая доле менее 1 %). Заметим, что основные и вспомогательные составляющие чаще всего являются жидкостями, а модификаторы могут быть как жидкими (например, трифторуксусная кислота или триэтиламин) и твёрдыми (например, фосфат калия или ацетат натрия).

Чтобы эффективно использовать многокомпонентный элюент, нужно знать химические и физические свойства как этих компонентов по отдельности, так и результирующей смеси. В данном разделе рассмотрены важнейшие из таких свойств: граница пропускания в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, спектральная зависимость коэффициента поглощения растворителей, вязкость, смешиваемость и растворимость, устойчивость и реакционная способность, влияние на флуоресценцию и содержание твёрдых микрочастиц.

3.1.А. Граница пропускания в УФ диапазоне

Сама по себе граница пропускания не является важным параметром. Но большинство изготовителей приводят этот показатель для партии растворителя на этикетках, наклеенных на бутыли с растворителем. Поэтому по границе пропускания можно в первом приближении судить о том, меняются ли свойства растворителя от партии к партии.

Практическое определение границы пропускания растворителя в УФ диапазоне таково: это минимальная длина волны, при которой коэффициент поглощения растворителя в 1-см кювете равен коэффициенту поглощения воздуха в такой же кювете. Математическая зависимость между коэффициентом поглощения, интенсивностью падающего пучка и интенсивностью проходящего пучка на данной длине волны описывается законом Бэра:

$$\lg (1/T) = \lg(I/I_0) = A = \varepsilon bc, \qquad (3.1)$$

где T – коэффициент пропускания, I_0 – интенсивность падающего пучка, I – интенсивность проходящего пучка, A – коэффициент поглощения, ε – молярный коэффициент поглощения данного вещества (л/М·см), b – длина кюветы (см) и c – концентрация вещества (М/л).

При ближайшем рассмотрении уравнения (3.1) можно выявить некоторое противоречие. На самом деле падающее УФ излучение не отсекается при $A = 1$, а просто сильно ослабляется. Поэтому граница пропускания считается достигнутой, когда интенсивность проходящего пучка, попадающего на детектор, снижается до 10 % от интенсивности пучка, падающего на пробу. Это – искусственно введённый показатель, связанный с максимизацией параметров детектора.

Если в растворителе имеются примеси, общий коэффициент поглощения растворителя на длине волны λ будет определяться суммой «вкладов» каждой примеси x:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)_{раств.} bc_{раств.} + \sum_x \varepsilon(\lambda)_{прим.x} bc_{прим.x} \qquad (3.2)$$

Соответственно, примеси с высоким ε даже в небольших количествах или примеси с низким ε, но в больших количествах могут существенно сказаться на коэффициенте поглощения элюента. Поэтому для получения необходимых параметров анализа и достижения воспроизводимости результатов необходимо постоянно удалять такие примеси.

В таблице 3.2 показаны значения границы пропускания в УФ диапазоне для разных классов растворителей (например, в класс алкиловых спиртов входят метанол, *н*-пропиловый спирт, изопропиловый спирт и пр.). Обычно, если граница пропускания растворителя выше, чем рабочая длина волны излучения, используемого для анализа, возникает столь сильное фоновое поглощение, что работать в таком режиме просто нецелесообразно. Для чистых растворителей значения границы пропускания в УФ диапазоне приведены в Приложении, табл. 1.

Таблица 3.2.

Примерный диапазон значений границы пропускания для разных классов растворителей

Растворитель или класс растворителей	Граница пропускания, нм
Смесь ацетонитрила с водой	ниже 190
Парафины	от 190 до 205
Алкиловые спирты	от 205 до 220
Алкиловые эфиры	от 210 до 220
Алкилхлориды	от 220 до 270
Фреоны	от 225 до 245
Алкилацетаты	от 250 до 260
Алкиламиды	от 260 до 270
Бензол и алкилбензолы	от 270 до 290
Бензилхлориды	от 280 до 310
Алкилкетоны	от 320 до 340

Одним из важных исключений является случай, когда растворитель представляет собой компонент подвижной фазы с малой концентрацией, например, его объёмная доля составляет не более 10 %. В этом случае при работе вблизи границы пропускания в УФ диапазоне для 10-процентного компонента возникает фоновое поглощение на уровне коэффициента

поглощения 0,1. Обычно это приемлемо, несмотря на небольшое возрастание шума (это приводит к некоторому увеличению предела обнаружения), небольшое сокращение линейного рабочего диапазона и снижение чувствительности. Кроме того, фоновое поглощение, скорее всего, будет разным для разных партий растворителя с высоким коэффициентом поглощения.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ РС1. **Использование растворителей вблизи границы пропускания в УФ диапазоне**. Освоение промышленностью выпуска высокочистых растворителей для ВЭЖХ позволило на несколько порядков снизить пределы обнаружения, полностью исключить пики на нулевой линии в градиентном режиме и добиться несопоставимой с другими методами повторяемости параметров опыта от партии к партии растворителя. К сожалению, даже использование таких высокочистых растворителей ничего не меняет в теоретических ограничениях, налагаемых границей пропускания растворителя. Тем не менее, наблюдается постоянное стремление работать с УФ детекторами на всё меньших и меньших длинах волн, чтобы можно было анализировать вещества, содержащие слабопоглощающие хромофоры, имеющие максимумы поглощения в коротковолновом УФ-диапазоне. В настоящее время всё большую популярность приобретают методики, в которых детектирование осуществляется на длине волны 210 нм, 205 нм, даже 200 нм.

В процессе производства множества партий конкретного растворителя граница пропускания может меняться. Это изменение говорит о том, что сместился весь спектр пропускания растворителя, а не просто изменился коэффициент пропускания на границе. Например, у одного изготовителя граница пропускания в УФ диапазоне последовательно произведённых партий метанола может меняться от 202 нм до 205 нм. Более существенными различиями характеризуются растворители, выпущенные разными изготовителями, поскольку у них может быть разная технология производства.

В большинстве случаев такие различия никак не затрудняют анализ. Времена удерживания пиков, разрешение и т.п. параметры остаются неизменными. Другое дело – влияние на количественное определение. Если методика предполагает, что коэффициент поглощения анализируемого вещества измеряют на длине волны 205 нм, фоновое поглощение может измениться даже на 0,2. Рис. 3.2 иллюстрирует это явление на спектральных зависимостях коэффициента поглощения. Для обычного метанола, граница пропускания которого составляет 202 нм (×), коэффициент пропускания на 205 нм составляет около 0,84. Спектральная зависимость метанола с границей пропускания 205 нм (о) имеет здесь коэффициент пропускания 1,0, т.е. разница ΔA на 205 нм почти 0,2. Такое изменение сказывается на чувстви-

тельности (ΔA/Δконцентрации) и даже на линейном рабочем диапазоне методики. Кроме того, повышение фонового шума ведёт к снижению предела обнаружения и увеличению стандартного отклонения методики.

УСТРАНЕНИЕ. Если это вообще возможно, при анализе следует работать на длине волны детектора, по меньшей мере, на 20 нм выше границы пропускания растворителя. Для большинства растворителей это приводит к снижению фонового поглощения до 0,2 и ниже. Если это невозможно, следует снизить как можно сильнее концентрацию поглощающего растворителя, снова-таки с целью минимизации фонового поглощения.

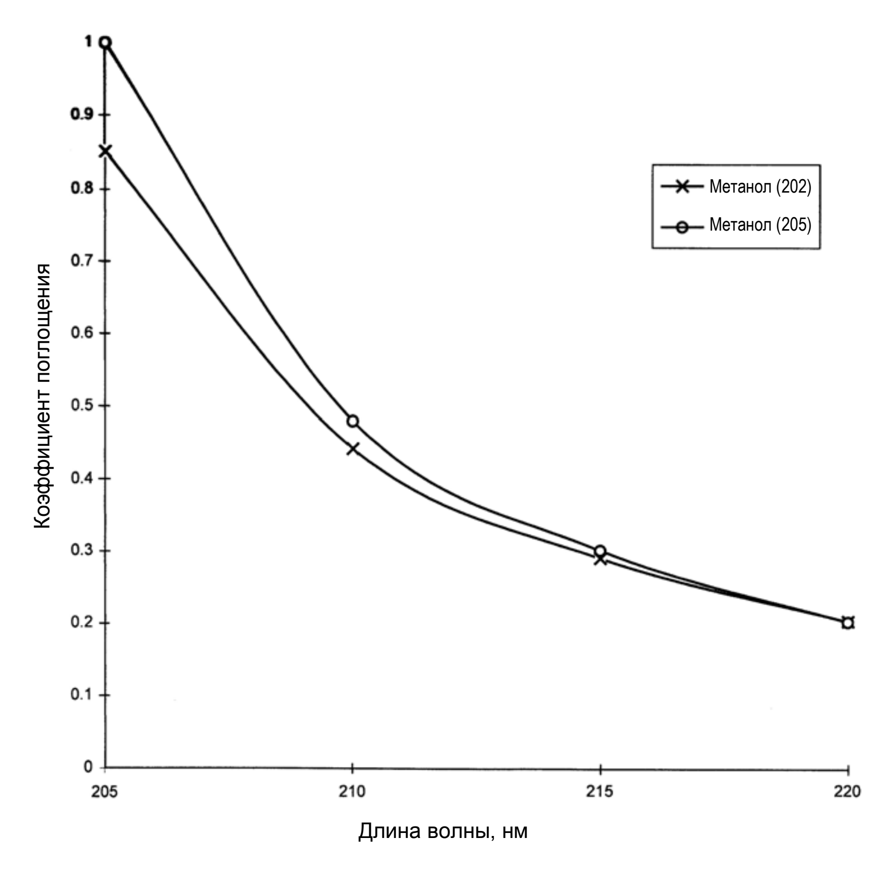


Рис. 3.2. Коэффициенты поглощения двух партий метанола с границей пропускания в УФ диапазоне 202 нм и 205 нм

Если ни один из этих вариантов не применим (т.е. методика уже прошла валидацию и широко распространена), возможно, окажется необходимым предварительно испытать и валидировать каждую партию растворителя до использования (предпочтительно даже до отгрузки с завода-изготовителя). Следует помнить, однако, что такие предварительные испытания сопряжены с трудозатратами аналитика и эксплуатацией приборов. Чтобы избежать этого, возможно, удастся согласовать с изготовителем выбор партий растворителя. Задавайте в технических условиях приемлемое значение границы пропускания для партии растворителя как можно ниже, разумеется, в разумных пределах. Например, требование границы пропускания на длине волны 204 нм для метанола или изопропилового спирта вполне может быть принято изготовителем, у которого вы приобретаете эти растворители систематически. С другой стороны, изготовитель может при этом установить минимальный объём заказа или назначить дополнительную плату за усилия по выполнению ваших особых требований.

3.1.Б. Спектральная зависимость коэффициента поглощения растворителей

Более важной с практической точки зрения является спектральная зависимость коэффициента поглощения растворителей. На рис. 3.3 А показаны характерные зависимости, полученные в 1-см кювете для широко применяемых растворителей для обращённо-фазной хроматографии: метанола, ТГФ (класса «УФ» или «Хранению не подлежит») и ацетонитрила. На рис. 3.3 Б показаны типичные спектральные зависимости растворителей для нормально-фазной хроматографии: гексана, этилацетата и дихлорметана, также снятые с 1-см кюветой. Важно понимать, что далеко не для всех растворителей спектральные зависимости имеют форму, близкую к экспоненте или модифицированному нормальному распределению. Кроме того, при использовании в качестве детектора матрицы фотодиодов важно понимать, что спектр растворителя входит как составляющая в нескорректированный спектр анализируемого вещества.

3.1.Б.1. Элюенты для обращённо-фазной хроматографии. Эти элюенты, как правило, представляют собой смеси разных органических растворителей с водой. Вода идеально подходит для большинства методик с детектированием в УФ диапазоне, поскольку выше 188 нм она не поглощает. Главным достоинством воды как химического вещества и растворителя является то, что она преобразует в растворимую форму многие важные анализируемые вещества. К её главным недостаткам можно отнести огра-

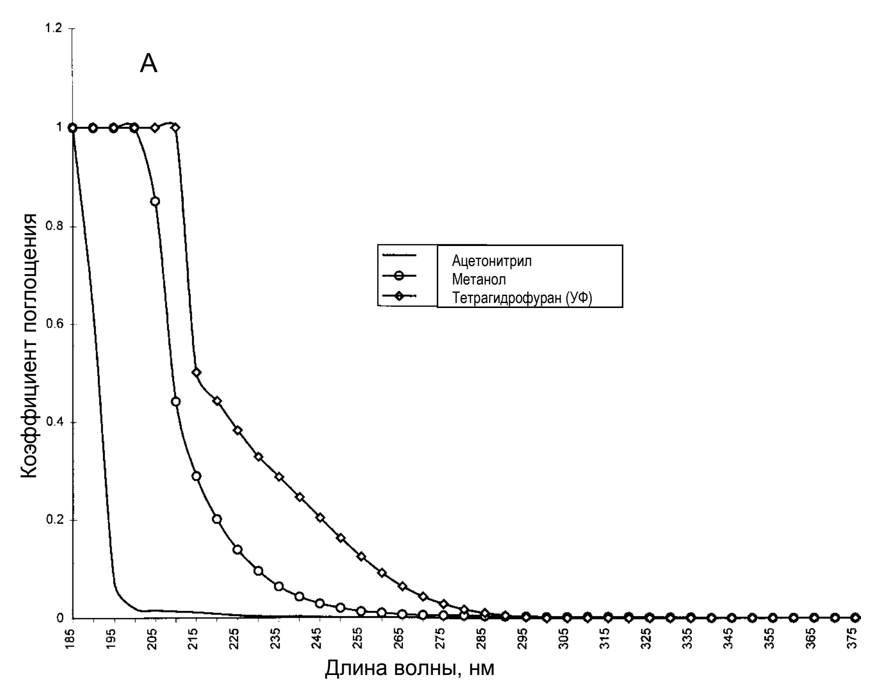


Рис. 3.3. Спектральные зависимости коэффициента поглощения: (А) ацетонитрил, метанол и тетрагидрофуран (продолжение на следующей странице).

ниченную смешиваемость большинства растворителей (см. Приложение, табл. 9).

Граница пропускания ацетонитрила весьма низкая – выше 190 нм. Кроме того, даже на малых длинах волн, в районе 200 нм, ацетонитрил даёт крайне малое фоновое поглощение (< 0,05) [важность спектральной зависимости коэффициента поглощения понимают многие изготовители, поэтому некоторые изначально включают эти зависимости в каталоги (например, фирма Бердик энд Джексон, а другие (например, Фишер, И-эм сайнс, Джей-ти Бейкер) направляют их по требованию в разных видах (на отдельных листах или в сшитых буклетах)]. Благодаря таким почти идеальным спектрофотометрическим качествам в сочетании с прекрасной способностью преобразовывать множество веществ в растворимую форму, высокой химической устойчивостью и низкой реакционной способностью, а также уникальным хроматографическим параметрам, ацетонитрил стал наиболее широко используемым органическим растворителем для обращённо-фазного разделения.

Следующим по частоте применения идёт метанол. Граница пропускания метанола в УФ диапазоне находится на 205 нм. Если бы форма спектральной зависимости коэффициента поглощения метанола $A(\lambda)$ была такой же, как у ацетонитрила, он должен был бы почти или вовсе не обнаруживать поглощения на 215 нм. К сожалению, как видно из рис. 3.3 А, это не так. В действительности на 215 нм метанол всё ещё имеет коэффициент поглощения более 0,3. Ценность спектральных зависимостей типа показанных на рис. 3.3 А и Б в том, что они позволяют хроматографисту быстро оценить наибольшую концентрацию органического растворителя, при которой ещё удаётся работать ниже требуемого уровня фонового поглощения или хотя бы на этом уровне.

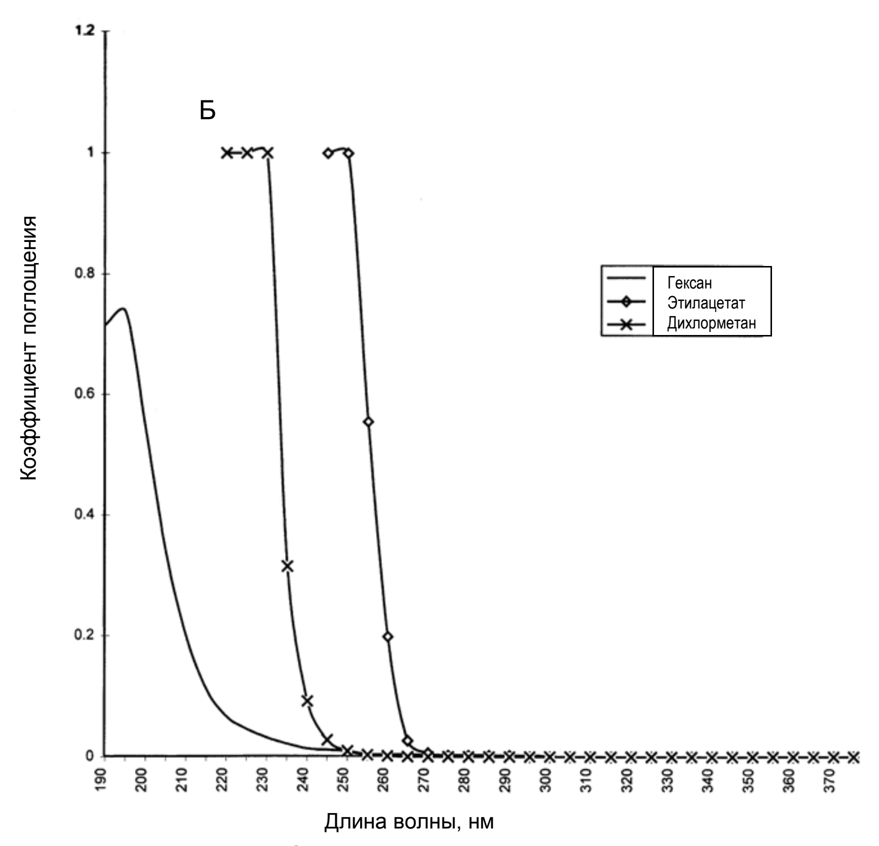


Рис. 3.3 (продолжение). Спектральные зависимости коэффициента поглощения: (Б) гексан, этилацетат, дихлорметан (коэффициент поглощение свыше 1,0 показан как граница пропускания на 1,0).

Например, чтобы фоновое поглощение, обусловленное метанолом, было менее 0,05, нужно работать при $\lambda > 235$ нм или, если метанола в смеси менее 15 %, при $\lambda = 215$ нм. Это, очевидно, весьма затруднительно, если растворяемые вещества обладают низким молярным коэффициентом поглощения или имеют максимум поглощения своего хромофора ниже 235 нм. Соответственно, выбор органического растворителя может радикально сказаться на воспроизводимости методики.

Тетрагидрофуран также часто используют в обращённо-фазной хроматографии, поскольку он смешивается с водой и превосходно переводит множество веществ в растворимую форму. Спектр ТГФ в ультрафиолетовой области также представляет интерес поскольку даже на 250 нм это вещество ещё имеет ощутимый коэффициент поглощения – около 0,2. По этой причине, равно как и по ряду других, изложенных далее, причин, ТГФ обычно используют в подвижных фазах в концентрациях до 10 %.

Изопропиловый спирт (ИПС) находит не столь уж широкое применение как компонент подвижной фазы из-за высокой вязкости. Однако ИПС очень хорошо подходит как растворитель для очистки колонок, а также как промежуточный обоюдно смешивающийся растворитель при переводе хроматографической установки или колонки с нормально-фазного на обращённо-фазный вариант или наоборот.

Важным моментом обращённо-фазной хроматографии является работа в градиентном режиме. Градиентным называется такой режим, при котором в течение хроматографического опыта состав подвижной фазы изменяется. В большинстве случаев в начале градиентного опыта подвижная фаза слабее всего (содержит максимальное количество воды), затем её состав изменяется до наиболее сильного элюента (содержит наибольшее количество органических компонентов). Изменение состава подвижной фазы может привести к изменению отклика детектора.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 2. **Сдвиг нулевой линии в градиентном режиме**. Примером может служить рис. 3.4, иллюстрирующий поведение нулевой линии в типичном градиентном режиме хроматографа с УФ детектором.

На рисунке показаны три разных варианта развития событий. Две нижние кривые соответствуют отклику детектора в градиентном режиме на смеси ацетонитрила с водой при детектировании на 254 нм и 210 нм. Для целей обсуждения будем считать, что кривые разбиваются на три участка: начальная нулевая линия, сигмоидальная кривая подъёма и конечное плато.

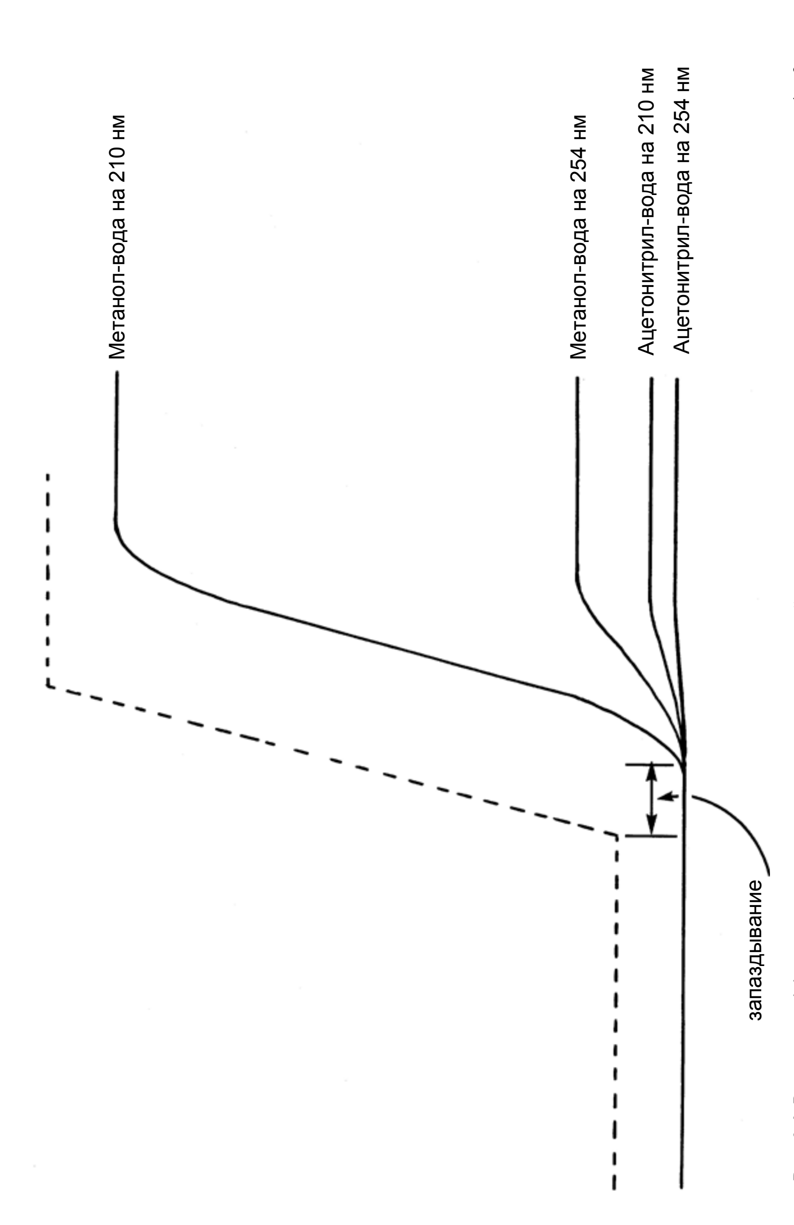


Рис. 3.4. Влияние коэффициента поглощения растворителя у нулевой линии на типичные хроматограммы в градиентном режиме (от 0 до 100) для смесей метанола с водой и ацетонитрила с водой при детектировании на различных длинах волн. Подъём нулевой линии на 254 нм в градиентном режиме с ацетонитрилом обусловлен изменением коэффициента преломления растворителя, а не фоновым поглощением ацетонитрила. Штриховой линией показано изменение состава подвижной фазы в сторону увеличения органического растворителя

Обычно самый низкий отклик детектор даёт в начальной части хроматограммы, т.е. на нулевой линии (когда концентрация воды в элюенте максимальна). По мере изменения состава подвижной фазы, отклик возрастает, вплоть до достижения конечного состава. Наложение графика, иллюстрирующего изменение состава подвижной фазы на выходе насоса (штриховая линия), на хроматограмму (сплошные линии) показывает, что имеет место запаздывание между достижением некоторого состава элюента на выходе насоса и в детекторе. Это запаздывание равно частному от деления общего объёма системы между выходом насоса и детектором на расход подвижной фазы.

Несмотря на то, что ни ацетонитрил, ни вода не дают никакого поглощения на 254 нм, имеется, пусть небольшой, но вполне измеримый, сдвиг нулевой линии. Сдвиг нулевой линии на 210 нм уже обусловлен изменением коэффициента поглощения. Если снять аналогичные кривые для подвижной фазы, в которой вместо ацетонитрила используется метанол, конечное плато характеризуется ещё бóльшим коэффициентом поглощения на длине волны 254 нм. Если же в этом градиентном режиме для смеси метанола с водой вести детектирование на 210 нм, коэффициент поглощения на плато будет значительно выше. Как объяснить эти различия?

В случае ацетонитрила никакого поглощения подвижной фазой на самом деле нет. Кажущееся изменение коэффициента поглощения обусловлено в действительности изменением её коэффициента преломления. Поскольку изменение коэффициента преломления вещества, заполняющего кювету детектора, приводит к некоторому изменению направления прохождения пучка сквозь неё, это вызывает изменение отклика детектора. Почему же наблюдается увеличение коэффициента поглощения? Потому что обычно пучок сфокусирован на диоде детектора, чтобы получить наиболее интенсивный сигнал, поэтому при любом отклонении интенсивность сигнала падает, как если бы детектор регистрировал увеличение поглощения. Эффект, наблюдаемый на 254 нм для метанола, объясняется совместным действием *как* изменения коэффициента преломления, *так и* ненулевым молярным коэффициентом поглощения метанола на этой длине волны. На 210 нм для метанола поглощение играет главную роль в изменении отклика детектора на нулевой линии.

Рассмотренный пример иллюстрирует два важных соображения. Во-первых, даже если составляющие подвижной фазы сами по себе не должны вызывать сигнал детектора, изменение некоторых их физических характеристик может на практике повлиять на отклик детектора. Сказанное справедливо не только для ультрафиолетовых, но и для электрохимических и флуориметрических детекторов. Во-вторых, когда подвижная фаза действи-

тельно генерирует заметный отклик детектора на нулевой линии, даже небольшое её изменение (как в примере с метанолом) может привести к катастрофическим последствиям в хроматографическом опыте.

УСТРАНЕНИЕ. Старайтесь не использовать подвижную фазу, которая даёт ненулевой отклик детектора. Именно это, и в основном это соображение является причиной явного преобладания ацетонитриловых и фосфатных буферов в градиентной ВЭЖХ с УФ детекторами. Для важных опытов предварительно выполните аттестацию партии растворителя (например, метанола) в холостом опыте, чтобы получить профиль нулевой линии. Если возможно, используйте именно эту партию растворителя для последующих анализов.

3.1.Б.2. Элюенты для нормально-фазной хроматографии. В нормально-фазной хроматографии чаще других растворителей используется гексан. Главными соображениями в пользу применения гексана для большинства веществ, анализируемых в нормально-фазном режиме, являются, как и в случае ацетонитрила, низкая граница пропускания в УФ диапазоне (195 нм) и малое фоновое поглощение при 210 нм и выше (см. рис. 3.3 Б). Неполярный характер гексана резко ограничивает его способность переводить в растворимую форму полярные соединения. Поэтому для обеспечения элюирования в подвижную фазу зачастую добавляют в небольшом количестве (объёмная доля обычно не более 5 %) более полярные вещества, например, дихлорметан или этилацетат. Поскольку гексан плохо растворяется в воде и ацетонитриле, его редко используют в обращённо-фазных разделениях.

Дихлорметан (метиленхлорид) имеет границу пропускания 233 нм и может быть эффективно использован для соединений с хромофорами, имеющими максимум выше 250 нм. Хотя дихлорметан широко применяется как небольшая добавка к подвижной фазе в нормально-фазной хроматографии, его использование в обращённо-фазном режиме не получило распространения из-за низкой растворимости в воде. А вот его хорошая смешиваемость с парафинами и высокая способность переводить вещества в растворимую форму, чрезвычайно полезны для нормально-фазного разделения.

Рассмотрим также ацетон, не столько потому, что его часто используют в обращённо-фазной или нормально-фазной хроматографии, а потому, что, во-первых, он переводит в растворимую форму настолько широкий спектр веществ, что зачастую о нём говорят, как об «универсальном растворителе», и, во-вторых, его спектральные характеристики весьма характерны для кетонов, которые могут найти весьма важное, пусть и ограниченное, применение.

По имеющимся опубликованным данным граница пропускания ацетона в УФ диапазоне – 330 нм. Если судить только по этому критерию, «окно», которое он предоставляет, вообще вряд ли можно использовать. Однако при ближайшем рассмотрении оказывается, что коэффициент поглощения водного раствора ацетона (объёмная доля 10 %) в диапазоне от 205 до 220 нм (рис. 3.5) падает до приемлемого значения. Следовательно, ацетон в частности и кетоны вообще можно использовать в небольших концентрациях как компоненты элюентов для анализа в диапазоне от 205 до 220 нм. Поскольку эта часть ультрафиолетового диапазона находится ниже грани-

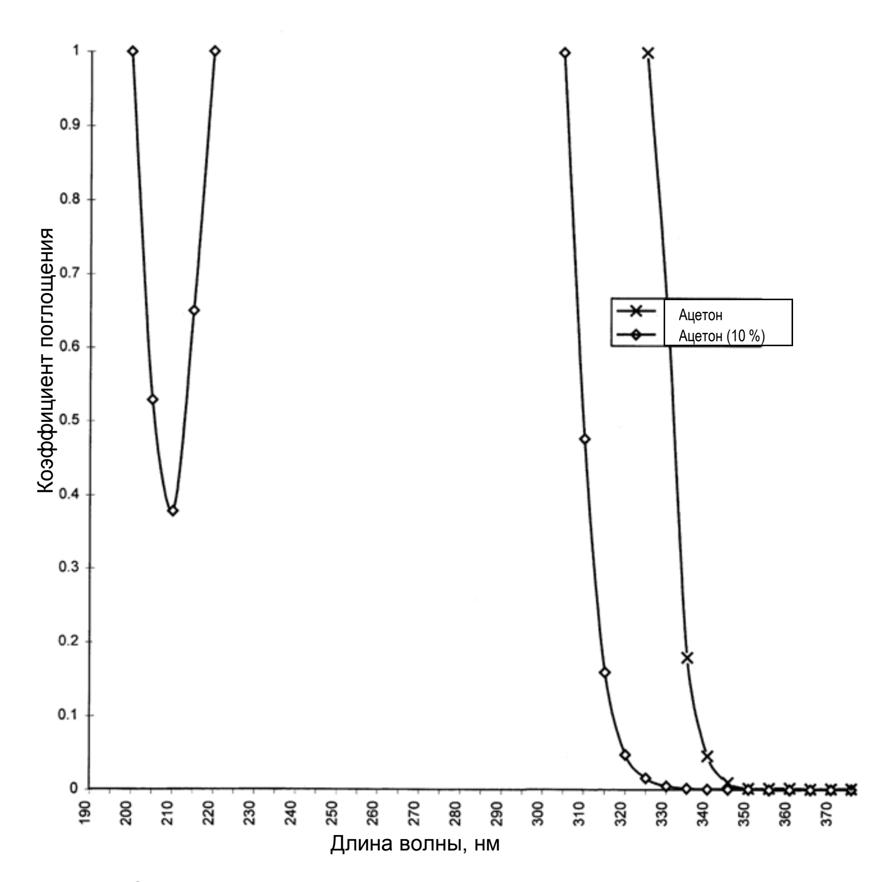


Рис. 3.5. Спектральная характеристика коэффициента поглощения чистого ацетона (×) и водного раствора ацетона (◊). Следует обратить внимание на область в районе 210 нм для 10 %-ного раствора.

цы пропускания, изготовители ацетона не проверяют его поглощение на таких длинах волн. Соответственно, крайне незначительные изменения параметров готового растворителя, обусловленные характеристиками сырья, обработкой хранением и пр., весьма существенно скажутся на поглощении в указанном диапазоне от 205 до 220 нм. Чтобы обеспечить приемлемые параметры, может понадобиться предварительная аттестация партий растворителя.

3.1.В. Фоновый сигнал от растворителя

То, что спектральные характеристики коэффициентов поглощения растворителей существенно различаются, ставит перед хроматографистом ряд задач. В простейшем случае изократического опыта с простыми непоглощающими подвижными фазами, фоновый сигнал просто прибавляется к общему приборному шуму – от насоса, детектора и пр. В более сложном градиентном режиме, когда подвижная фаза содержит слабо поглощающие компоненты, могут образовываться пики. Наконец, в градиентном режиме изменение состава элюента зачастую приводит к изменению нулевой линии в виде сигмоидальной кривой, что сходно с графиком изменения состава. Примеси, содержащиеся в растворителе, в градиентном режиме часто дают воспроизводимые пики.

Фоновый шум создаёт значительные затруднения, если разделение проходит на самом высоком уровне чувствительности детектора (например, вся шкала 0,005 или даже меньше). В подобных случаях фон элюентов заметен даже в идеальных условиях. Эти затруднения обусловлены множеством факторов.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 3. **Слишком большой фоновый шум в изократическом режиме; обусловлен органической составляющей подвижной фазы**. Хотя в дальнейшем рассматривается только УФ детектор, порядок устранения нештатной ситуации будет аналогичным для многих других детекторов. Во всех случаях, когда детектирование сигнала осуществляется на длине волны, где поглощение элюента или фоновый шум растворителя ненулевые, разброс характеристик растворителя от партии к партии может привести к значительным изменениям уровня шума.

УСТРАНЕНИЕ. Хотя источник нештатной ситуации не зависит от хроматографиста, есть ряд мер, которые следует принять, чтобы минимизировать вредные последствия. Во-первых, удостоверьтесь в том, что в качестве компонента подвижной фазы используется органический растворитель надлежащего типа. В некоторых случаях забывают, что многие органические вещества выпускаются промышленностью в разных классах чистоты. К

примеру, ацетонитрил продаётся следующих классов: технический, химически чистый, не для спектрофотометрии, с малым содержанием воды, для ВЭЖХ, для УФ-спектрометрии. Как правило, для ВЭЖХ подходят только последние два класса. Если растворитель ещё и химически неустойчив, как тетрагидрофуран, он выпускается в вариантах, как допускающем длительное хранение (обычно с добавкой бутилгидрокситолуола), так и не допускающем хранения. В некоторых случаях их обозначают, соответственно, «не для спектрофотометрии» и «для УФ-спектрометрии».

К сожалению, слишком часто лаборатории переплачивают за качество растворителя, которое не нужно для анализа. Примером такого рода является применение ацетонитрила класса «для УФ-спектрометрии» с рефрактометрическими и испарительными нефелометрическими детекторами. Для такого анализа вполне достаточно ацетонитрила класса «не для спектрофотометрии».

Во-вторых, если важность анализа велика, возможно, придётся перед анализом испытать партию растворителя на предмет фонового шума. Особенно важно это в случае высокой чувствительности и градиентного режима. В-третьих, и в продолжение второго шага, убедитесь в том, что растворителя из одной партии достаточно для проведения всей серии анализов. Если его недостаточно, смешайте растворитель из разных партий, и лишь затем готовьте элюент. Возможно, перед употреблением этот смешанный растворитель также придётся испытать.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 4. **Слишком большой фоновый шум в изократическом режиме; обусловлен модифицирующей водной составляющей подвижной фазы**. В этом случае надлежит рассмотреть два компонента водной составляющей подвижной фазы: собственно воду и фосфатный буфер – несколько солей или одну соль и H_3PO_4.

УСТРАНЕНИЕ. Промышленность выпускает воду в невероятном количестве разных классов: химически чистая по нормативам химического общества США (в пластмассовых бутылях из-за высоких требований к применению с силикагелем), для ВЭЖХ (в стеклянных бутылях янтарного цвета), высокой чистоты, деионизованная, дистиллированная, не содержащая пирогенов, а также в разных вариантах, предназначенных и не предназначенных для длительного хранения. Как минимум, качество воды должно соответствовать требованиям для применения в ВЭЖХ. Вода, приобретённая у изготовителя растворителей для ВЭЖХ, обычно не вызывает никаких затруднений, при условии надлежащего хранения и обращения. Итак, следует выбирать воду класса «для ВЭЖХ».

Воду для собственных нужд можно также изготавливать самостоятельно – это и хорошо, и плохо. Хорошо то, что воду приемлемой для ВЭЖХ чистоты можно получать по потребности, и она будет в несколько раз дешевле покупной. Плохо – то, что предполагается, будто полученная таким образом вода подходит для ВЭЖХ всегда. Единственная проверка, которой такая вода подвергается,– это кондуктометрия, которая, во-первых, не эффективна с точки зрения контроля содержания органических примесей, и, во-вторых, крайне мало чувствительна к медленному постепенному изменению концентрации ионов, поступающих из ионообменных смол. Следовательно, необходима тщательная и регулярная профилактика, заключающая в зарядке и замене фильтров и ионообменников. Это особенно существенно в тех случаях, когда результаты важного анализа с высокой чувствительностью определяются чрезвычайно низкой фоновой концентрацией ионов.

Совершенно другим должен быть подход к другому вопросу – микробиологическому загрязнению хроматографа. Вопрос этот возникает постоянно. Устранить такое загрязнение поможет регулярное промывание или постоянная рециркуляция хроматографической системы. Кроме того, росту бактерий препятствует интенсивное ультрафиолетовое облучение воды. Существенным затруднением является также нарастание бактерий на сливном трубопроводе хроматографа. Продукты их жизнедеятельности могут существенно исказить результаты детектирования, особенно электрохимического и ультрафиолетового на малых длинах волн. Как и в рассмотренных выше случаях, важно периодически проводить холостой опыт, пропуская через хроматограф воду. Итак, чтобы избежать погрешностей в работе, обусловленных водой собственного производства, необходимо разработать программу испытаний и профилактических мероприятий и неукоснительно её придерживаться.

Важно также помнить, что и качество исходной воды далеко не постоянно. Водопроводную воду обычно хлорируют и фторируют. Но в течение года концентрация этих веществ в воде различается очень сильно. Летом воду хлорируют сильнее всего, чтобы предотвратить размножение бактерий. Зимой степень хлорирования самая низкая, соответственно, в воде содержится меньше всего продуктов хлорирования (например, хлороформа).

Ещё одним потенциальным источником загрязнения являются добавки к воде, с помощью которых образуют водные буферы (фосфаты и фосфорная кислота). Впрочем, в выпускаемых промышленностью веществах органические примеси содержатся в малых количествах (номинальное содержание обычно не выше 0,001 %). Металлы также могут содержаться разве что на

уровне следов. Это, а также то, что такие добавки к подвижной фазе используются в малых количествах, говорит о том, что такие загрязнители обычно ни к каким неприятным последствиям не приводят.

К сожалению, само то, что малого количества этих веществ хватает, чтобы приготовить большое количество элюента, приводит к тому, что вещество расходуется на протяжении многих лет. Обычно для долговременного хранения используют обычный склад химических реактивов, где имеется много разных органических соединений. В таких условиях возрастает опасность взаимного загрязнения воздушным путём. Загрязнение в результате длительного хранения может вызвать непредвиденные сложности в работе.

Если возможно, храните водные буферы и другие модификаторы подвижной фазы отдельно от других химикатов в хорошо проветриваемом помещении. На каждой бутыли проставляйте дату приобретения и дату вскрытия. Приобретайте эти вещества в количестве, минимально экономически оправданном или минимально достаточном для анализов, чтобы исключить длительное хранение и возможность загрязнения.

Если избежать загрязнения не удаётся, необходимо испытывать по отдельности каждый компонент, начиная с немодифицированной воды. Если устранить отклонения от нормального режима удаётся, сменив воду, можно считать доказанным, что причина этого отклонения заключалась именно в ней. Если нет, надлежит последовательно испытать по отдельности все компоненты буферного раствора.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 5. **Наличие системных пиков**. Наличие системных (обусловленных самой хроматографической установкой) пиков, их высота и время выхода определяются сложной зависимостью между матрицей пробы, вводимым объёмом пробы, составом подвижной фазы и типом материала набивки колонки. Обычно системные пики соответствуют зонам обеднения и обогащения элюата теми или иными компонентами подвижной фазы. Эти пики могут появляться на любом участке хроматограммы, и если система достигла равновесного состояния, они обладают воспроизводимостью (см. рис. 3.6). Если системные пики в процессе анализа перемещаются, это говорит о том, что между последовательными вводами проб хроматографическая система не достигала равновесия. В подобном случае следует перед вводом каждой очередной пробы уравновесить систему.

Чаще всего системные пики появляются поблизости от момента выхода неудерживаемого вещества. Почти всегда их наличие обусловлено тем, что растворитель, использованный для пробоподготовки, не совпадает по

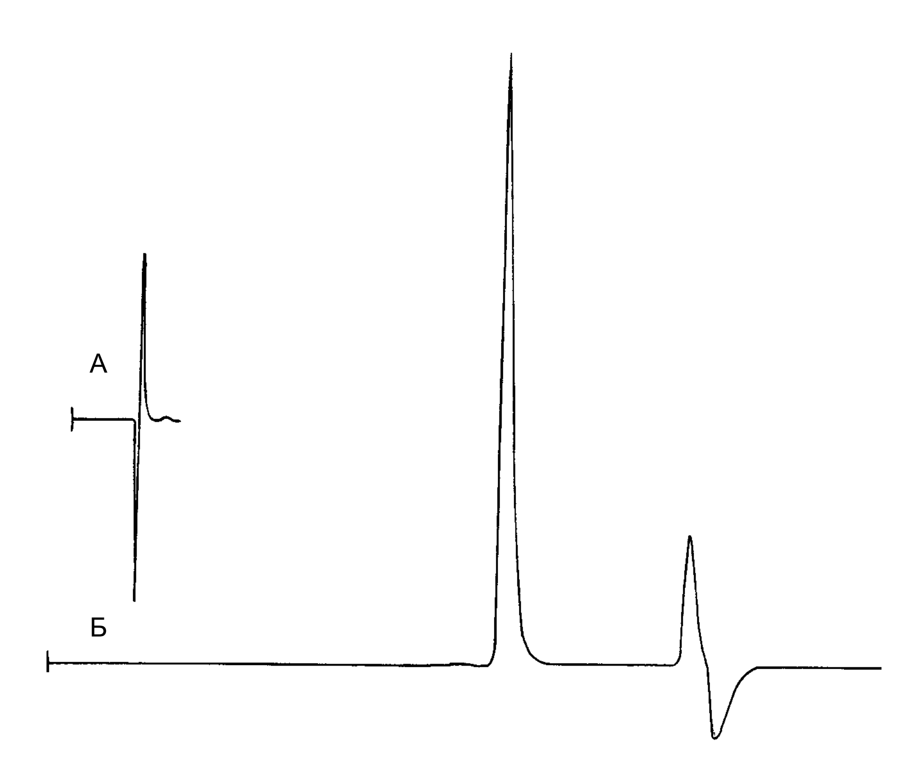


Рис. 3.6. Системные пики на хроматограмме ВЭЖХ. (А) Часто наблюдаемое импульсное изменение коэффициента преломления в момент, соответствующий выходу неудерживаемого вещества. Как правило, говорит о несовпадении состава растворителя пробы с составом подвижной фазы; в данном случае соответствующие компоненты не удерживаются колонкой. (Б) В этом случае системный пик выходит после пика анализируемого вещества, т.е. соответствующие компоненты хорошо удерживаются колонкой

составу с подвижной фазой. Если чувствительность детектора очень высока, к появлению пиков может привести даже различие параметров растворителя от партии к партии. Вопрос об опасности неверной интерпретации при выходе таких пиков (в частности, о выходе отрицательных пиков одновременно с пиками определяемых веществ) как в нормально-фазной, так и в обращённо-фазной хроматографии широко обсуждается в печати [1].

УСТРАНЕНИЕ. Чтобы определить, какими именно веществами вызвано появление системных пиков, последовательно вводят ряд проб. В первом (холостом) опыте в подвижную фазу вводят пробу этой же подвижной фазы. Затем вводят пробу растворителя для пробоподготовки, но без ана-

лизируемых веществ (если этот растворитель не совпадает в точности по составу с подвижной фазой), затем подвижную фазу без модификаторов, и, наконец, подвижную фазу с модификаторами. Следует также запомнить, что изменения параметров растворителей и модификаторов от партии к партии может также привести к появлению системных пиков, которые в других случаях обычно не наблюдаются.

Появление системных пиков в каких-либо или всех описанных случаях позволяет определить, какими компонентами они обусловлены. Например, если растворитель для пробы не содержит модификатора, имеющегося в подвижной фазе, либо если растворитель для пробы значительно отличается по составу от подвижной фазы, может наблюдаться ряд системных пиков.

Лучший способ минимизации количества и высоты системных пиков состоит в том, чтобы, во-первых, по возможности растворять пробу в элюенте (для этого на определённом этапе может понадобиться изменить состав элюента), во-вторых, для приготовления подвижной фазы и растворителя для пробы использовать растворитель из одной и той же партии, и, в третьих, использовать такие установки детектора (уровень чувствительности, длину волны), при которых растворитель пробы и подвижная фаза вовсе не дают или дают очень малый уровень сигнала.

Следует отметить, что если даже при использовании УФ детектора выполнено второе из указанных условий, из-за различий коэффициента преломления растворителя для пробы и подвижной фазы могут возникать «псевдопики», обусловленные изменением преломления, или сдвиг нулевой линии. Такие псевдопики могут выходить в любой момент в ходе элюирования и вводить экспериментатора в заблуждение, особенно если чувствительность детектора высока.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 6. **Значительный сдвиг спектра поглощения элюента**. Сдвиг – это смещение всего спектра поглощения элюента в область бóльших или меньших длин волн. При этом могут сильно меняться фоновый сигнал и уровень шума.

УСТРАНЕНИЕ. Обычно сильнее всего сдвиг сказывается при работе вблизи границы пропускания растворителя в УФ диапазоне. Следовательно, его влияние на результаты анализа нетрудно прогнозировать, если располагать информацией как о границе пропускания, так и о характере спектра. В большинстве случаев это влияние можно практически исключить, если работать на длинах волн хотя бы на 20 нм больше, чем паспортная граница пропускания растворителя. Если же это не представляется возможным, нужно передать изготовителю технические условия на растворитель с

заданными характеристиками, чтобы поставляемые им партии растворителя удовлетворяли требованиям методики. Кроме того, следует использовать во всём ходе анализа растворитель для пробы и подвижную фазу из одной и той же партии.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 7. **Совершенно непрогнозируемые аномалии спектра, обычно вызванные небольшими изменениями в составе сырья или технологии производства**. Такие изменения могут сами по себе обусловливать дополнительные перегибы, а в крайних случаях – даже плато в спектре поглощения растворителя. Хуже всего сказывается присутствие в растворителе ароматических загрязнителей, из-за которых в спектре появляются широкие пики имеющие малое поглощение в диапазоне между 250 и 280 нм.

УСТРАНЕНИЕ. Изменения, связанные с аномалиями спектра, очень неприятны при изократических анализах. Обычно сдвиг нулевой линии имеет место при изменении состава подвижной фазы. Но если в растворителе присутствуют примеси, колонка адсорбирует их вплоть до насыщения, т.е. до достижения равновесия концентраций примесей в подвижной фазе и колонке. При этом нулевая линия постоянно смещается (вверх или вниз, в зависимости от разницы коэффициента поглощения старой и новой подвижной фаз), пока хроматографическая установка не уравновешивается. После достижения равновесия нулевая линия больше не смещается. Если общее изменение коэффициента поглощения невелико, это, как правило, не сказывается на результатах хроматографического анализа. Однако если для приготовления проб, вводимых в хроматограф, не используется элюент того же состава, что и для анализа, на хроматограмме могут неожиданно появляться новые пики. Это особенно вероятно, если при пробоподготовке используют растворитель, обладающий более сильными элюирующими свойствами, чем подвижная фаза. По сути, вместе с пробой в колонку попадает зона сильного растворителя, вызывающая элюирование ранее адсорбированных колонкой примесей. Время удерживания и форма пика обычно воспроизводимы, если до ввода очередной пробы примесь и колонка успевают прийти в равновесие.

Лучший способ выяснить, чем обусловлена эта нештатная ситуация, – систематически по одному изменять компоненты растворителя пробы между последовательными вводами, начав с введения в подвижную фазу пробы, растворённой в этой же подвижной фазе. При этом будет получена истинная нулевая линия, от которой и следует отталкиваться при исследовании всех остальных переменных.

В градиентном режиме примеси в элюенте дают пики с неизменными временами удерживания, но разного размера (рис. 3.7). Эти пики могут загадочным образом исчезать, когда готовится свежий элюент, поскольку в новой партии растворителя таких примесей может и не оказаться.

Источником пиков примесей могут быть разные компоненты системы: (1) загрязнённый резервуар; (2) одна загрязнённая ёмкость с растворителем,

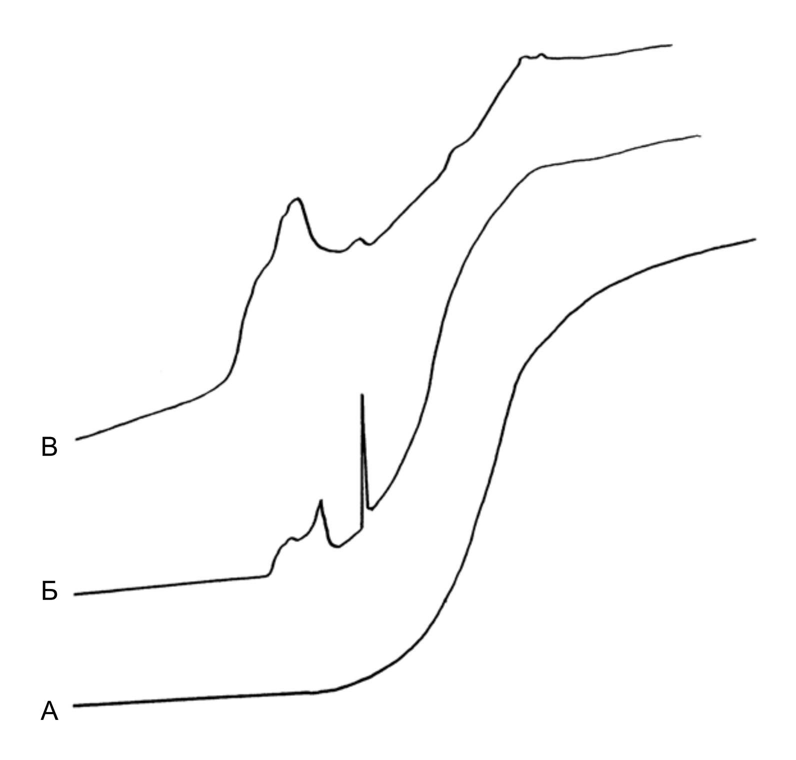


Рис. 3.7. Хроматограмма демонстрирующая обнаружение примесей, при работе в градиентном режиме. На длине волны 254 нм исследован метанол из трёх партий. Для исследования каждой партии растворителя использован один и тот же градиент (от смеси воды с метанолом в соотношении объёмных долей 80:20 до 100 % метанола). Плато на спектре поглощения наблюдается во всех трёх случаях на уровне около 0,15. (А) Хроматограмма смеси высококачественных метанола и воды. (Б) Хроматограмма на которой видны последствия использования загрязнённых растворителей. (В) Хроматограмма на которой видны последствия использования сильно загрязнённых растворителей. Данные хроматограммы не позволяют судить, являются ли источником примесей метанол, вода или оба эти вещества.

модификатором подвижной фазы или соли; (3) загрязнённая партия растворителя, модификатора подвижной фазы или соли; (4) загрязнения в растворителе или растворителях, используемых для пробоподготовки.

Чтобы оценить саму подвижную фазу, проще всего провести опыт в градиентном режиме от 100 % элюента А до меньшей доли А, изменяя выдержку перед началом градиента. Как вариант, можно оставить выдержку, когда состав элюента остается постоянным, но увеличивать объёмный расход, если на это не накладывается ограничение, связанное с повышением давления в системе при работе в градиентном режиме. Результаты показаны на рис. 3.8. В обоих случаях, если высота пика примеси прямо

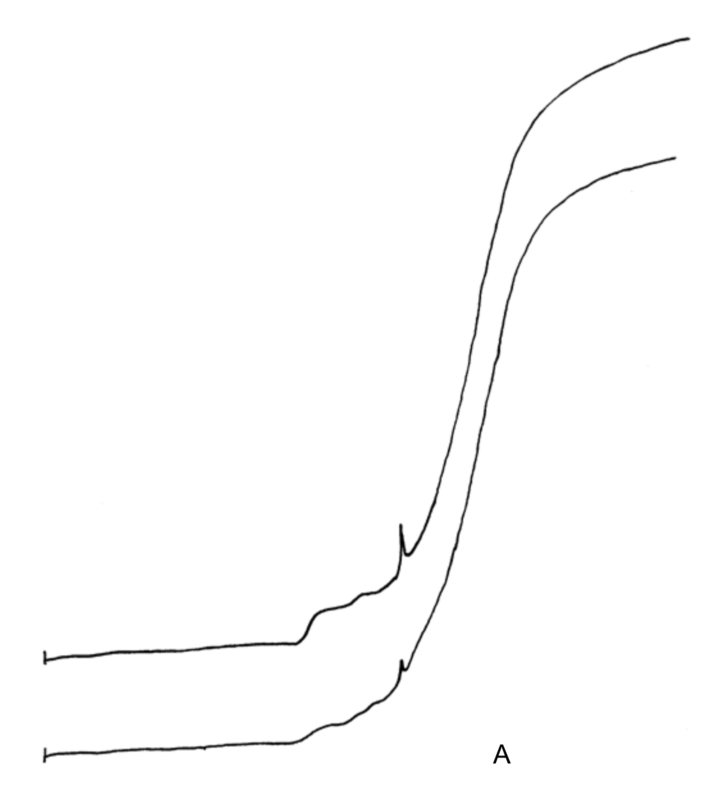


Рис. 3.8. Хроматограмма градиентного элюирования смеси ацетонитрила с водой. Первый градиентный опыт – нижняя кривая. (А) Скорость потока изменилась, размер пика увеличился (верхняя кривая). По все вероятности, загрязнён более слабый растворитель (вода) (продолжение на следующей странице).

пропорциональна объёму более слабого элюента, прокачанного через колонку между последовательными опытами в градиентном режиме, то примесь содержится в компоненте А. Единственный способ избавиться от

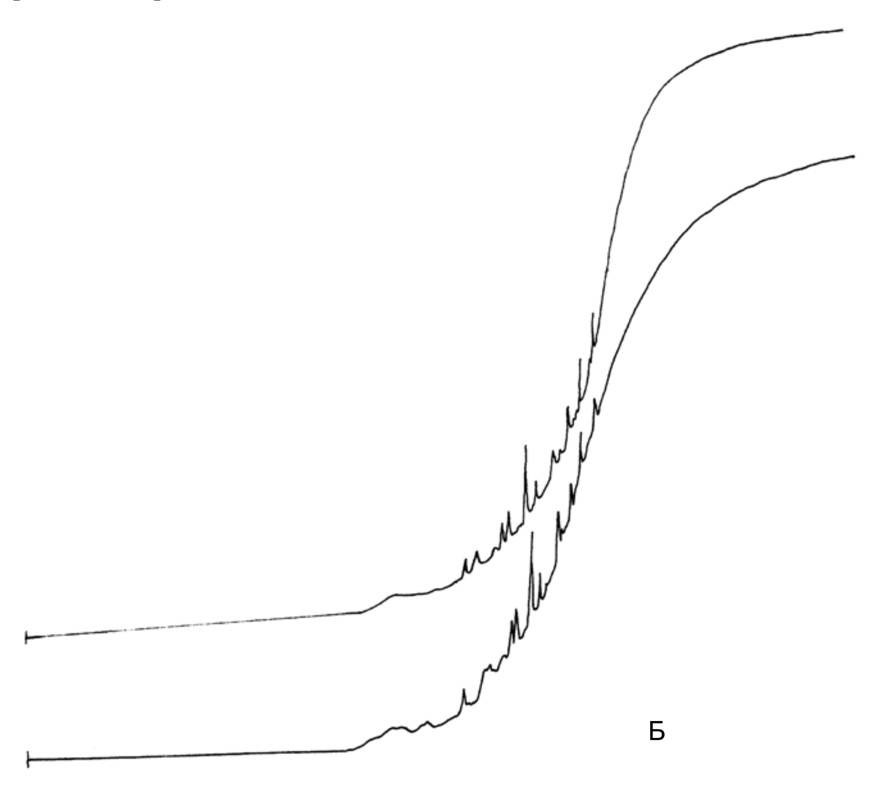


Рис. 3.8. (продолжение) (Б) Скорость потока изменилась, но вид хроматограммы не изменился. По всей вероятности, загрязнён более сильный растворитель (ацетонитрил).

этого пика – заменить загрязнённый растворитель. Впрочем, простая замена растворителя ещё не гарантирует устранения пика примеси. Прежде, чем заменять растворитель, промойте резервуар, трубопроводы и колонку чистым сильным растворителем, чтобы удалить примесь, накопившуюся в системе.

Если для реализации градиентного режима используется заранее приготовленная смесь элюентов, прокачиваемая насосом, для устранения описан-

ной нештатной ситуации необходимо испытать каждый элемент системы отдельно от других. Пики примесей исчезают, когда загрязнённый элемент устранён и заменён свежим незагрязнённым элементом. К тому же, поскольку примеси гораздо чаще содержатся во всей партии растворителя или модификатора, чем в одной «запечатанной» бутыли, при испытаниях следует, по возможности, использовать вещества из других партий.

Независимо от того, как реализуется градиентный режим (с помощью заранее приготовленных многокомпонентных элюентов или прокачивания со смешением чистых растворителей), убедитесь в том, что при выявлении причины нештатной ситуации используются только «запечатанные» ёмкости с растворителями. Только в этом случае можно с надёжностью полагать, что не имело место случайное загрязнение растворителя уже после откупоривания ёмкости. При исследовании обязательно заменяйте элементы системы и вещества по одному. Иначе установить однозначно источник неисправности не представится возможным. Помните также, что такой источник может быть не один. Наблюдайте и сравнивайте результаты замены каждого элемента.

Наконец, при переходе на другую партию растворителя примите меры, чтобы исключить взаимное загрязнение партий. Проще всего добиться этого так: налейте небольшое количество свежеприготовленного растворителя в чистый химический стакан. Отсоедините колонку, трубопровод от инжектора выведите в ёмкость для отработанной жидкости. Поместите входной фильтр инжектора в чистый растворитель, прокачайте систему. Пропустите через трубопроводы от 10 до 20 мл «нового» растворителя, затем поместите фильтр инжектора в резервуар с «новым» чистым растворителем и продолжайте прокачивать. После того, как весь объём трубопроводов установки прокачан, вновь присоедините колонку и детектор и прокачайте через них свежий растворитель.

Если приобрести новую партию какого-либо из материалов не представляется возможным, т.е. имеется только одна партия, необходимо при исследовании причин нештатной ситуации изменить соотношение более слабого и более сильного элюента по сравнению с исходным. Если при увеличении доли растворителя А размер пика увеличивается, скорее всего, именно растворитель А загрязнён и т.д. Помните, что после того, как источник примесей определён, необходимо не просто заменить загрязнённый материал, но и промыть всю установку для ВЭЖХ, чтобы полностью удалить остатки адсорбированной примеси.

К сожалению, когда уровень содержания примеси падает ниже примерно одной миллионной доли (1 млн$^{-1}$), выявить такую примесь только по

изменениям УФ спектра и границы пропускания чаще всего не представляется возможным. Поэтому, если анализ очень важен, возможно, придётся прибегнуть к услугам испытательной лаборатории, чтобы предварительно хроматографическими методами аттестовать растворители и убедиться в их пригодности к применению. Разумно также приобретать растворители у изготовителя с хорошей репутацией.

3.1.Г. Вязкость элюента

Вязкость, применительно к хроматографии, может в первом приближении рассматриваться как сопротивление, которое испытывает жидкость (подвижная фаза) при принудительном ее прокачивании (под действием насоса) на ограниченном отрезке пути (колонку). Из этого следует, что перепад давления на колонке зависит от вязкости растворителя, температуры в термостате хроматографа, разветвлённости пути через колонку, параметров трубопроводов и детектора, наконец, скорости потока. Результирующая сила, необходимая, чтобы протолкнуть растворитель через хроматограф, контролируется и выражается как «перепад давления» или просто «давление в системе».

К числу растворителей низкой вязкости принадлежат короткоцепочечные парафины (пентан, гексан, изооктан) и диалкиловые эфиры (этиловый эфир, МТБЭ), высокой вязкости – спирты (изопропиловый спирт и выше). Значения вязкости однокомпонентных растворителей приведены в Приложении, табл. 6. Труднее найти данные о вязкости многокомпонентных элюентов. Дело в том, что вязкость наиболее распространённых смесей растворителей *не является* линейной функцией долей составляющих. На рис. 3.9 показаны в графической форме зависимости вязкости растворителя от состава для смесей с водой ТГФ, метанола и ацетонитрила [2]. Эти зависимости нелинейны, при этом наибольшая вязкость смесей всегда выше, чем каждой составляющей по отдельности.

Зависимости вязкости от состава двух шире всего применяемых смесей – ацетонитрила с водой и метанола с водой – совершенно различны. Огромным преимуществом ацетонитрила перед другими растворителями является то, что наибольшая вязкость его смеси с водой всего на 20 % выше, чем вязкость воды. Напротив, вязкость смеси метанола с водой в соотношении 45:55 в 1,7 раза выше, чем вязкость воды. Аналогичная смесь *н*-пропилового спирта с водой имеет в 2,5 раза более высокую вязкость, чем вода. Такие широкие пределы изменения вязкости прямо влекут за собой необходимость повышать давление в хроматографе в два, а то и три раза в опыте с градиентным изменением соотношения спирта и воды от 0 до

100 %. Это важно при разработке методик поточного анализа, где хроматограф работает автоматически без надзора оператора. Чем выше вязкость растворителя, тем вероятнее отказы, сбои, повреждения и потеря данных из-за слишком высокого давления. Впрочем, вероятность подобных катастрофических случаев можно снизить, если выбрать рабочие параметры (например, расход элюента, длину колонки и диаметр частиц силикагеля) так, чтобы самый большой перепад давления в опыте был намного меньше предельно допустимого.

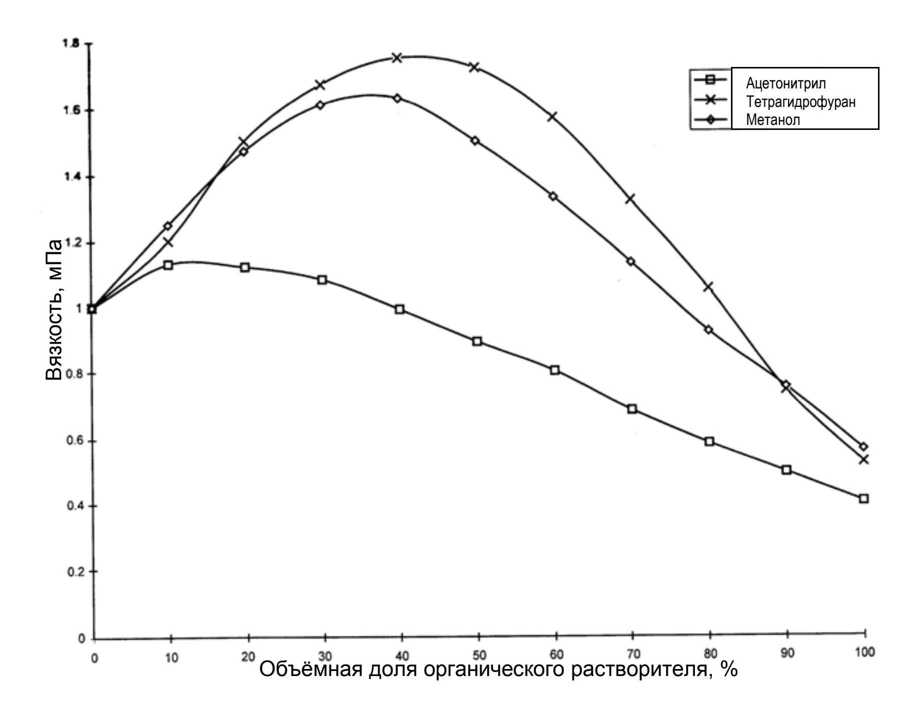


Рис. 3.9. Зависимость значения вязкости элюента от доли органического растворителя в смесях ацетонитрила, метанола и тетрагидрофурана с водой.

Рис. 3.9 имеет также важное практическое значение. Эмпирическое правило нахождения самого высокого значения давления для данной колонки при изменении состава элюента в градиентном режиме состоит в том, чтобы умножить начальный перепад давления на отношение самого высокого значения вязкости элюента к начальной вязкости. Итак, наибольшее давление в градиентном режиме определяется отношением значений вязкости начального состава элюента и элюента, состав которого обеспечивает

наибольшую вязкость. Например, если в опыте используется смесь метанола с водой в соотношении от 0 до 100 % метанола, а начальное давление составляет 6,9 МПа (1000 фс/дюйм^2), можно ожидать, что максимум давления составит около 11,7 МПа (1700 фс/дюйм^2) при соотношении объёмных долей воды и метанола 65:35, а затем упадёт примерно до 4,1 МПа (600 фс/дюйм^2) при 100 % метанола. Для аналогичного градиентного опыта с использованием смеси ацетонитрила с водой максимум давления составит всего около 8,3 МПа (1200 фс/дюйм^2) при соотношении объёмных долей воды и ацетонитрила 85:15 и упадёт до 3,4 МПа (500 фс/дюйм^2) при 100 % ацетонитрила.

В хроматографе для ВЭЖХ слишком высокое давление отрицательно сказывается, в первую очередь, на двух компонентах: насосе и колонке. Насосные системы, как правило, защищены от перегрузки по давлению. При достижении определённого максимума насос просто отключается. К сожалению, колонку защитить таким образом невозможно. Довольно часто колонка повреждается гораздо раньше, чем давление становится опасным для насоса. Поэтому настоятельно рекомендуется выбирать предельное рабочее давление в опыте, исходя из допустимого перепада давления на колонке, а не на насосе.

Как уже сказано, вязкость зависит от температуры. Для смесей растворителей, чаще всего используемых в ЖХ, при повышении температуры вязкость, а значит, и перепад давления, снижается. Следовательно, ощутимого снижения давления можно добиться, повышая температуру резервуара с элюентами, соединительных трубопроводов, инжектора и колонки. При этом важные хроматографические достоинства растворителей, обладающих высокой вязкостью, не утрачиваются. Вышесказанное весьма важно, поскольку даже сравнительно небольшое повышение температуры делает практически возможным применение растворителей с высокой вязкостью – таких, как изопропиловый спирт, *н*-пропиловый спирт, высшие спирты и диметилсульфоксид.

Подводя итоги, заметим, что вероятность возникновения избыточного перепада давления в градиентном режиме выше в смесях спиртов с водой, чем в смеси ацетонитрила с водой. Растворители, обладающие высокой вязкостью, широко и эффективно используются в ВЭЖХ, однако при условии полного понимания и учёта оператором ограничений, налагаемых на хроматограф.

Использование растворителей с высокой вязкостью приводит к снижению срока службы колонок (силикагелевая основа при этом разрушается

быстрее) и увеличению трудозатрат на техническое обслуживание насосов (поскольку, например, быстрее изнашиваются уплотнения плунжеров).

3.1.Г.1. Растворители обладающие низкой вязкостью

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 8. **Использование растворителей с низкой вязкостью, например, смесей гексана с этилацетатом в соотношении 99:1, не приводит к ожидаемым значениям давления даже при больших значениях скоростей потока**. Это может быть вызвано нарушением работы обратных клапанов на входе и выходе хроматографа и дестабилизацией потока элюента. Это, в свою очередь, приводит к нестабильности результатов и отсутствии воспроизводимости времен удерживания.

УСТРАНЕНИЕ. Самой простой мерой борьбы с этой проблемой является увеличение расхода. В подобных случаях обычно необходимый объёмный расход элюента составляет от 3 до 4 мл/мин. К сожалению, при таком большом расходе обратный ход насоса происходит очень быстро, и это, в сочетании с низкой вязкостью растворителя, может вызвать кавитацию (вскипание) в клапанах насоса. Чтобы устранить этот недостаток и повысить давление, можно использовать набивку с меньшим диаметром частиц или установить дополнительно предколонку.

Можно также использовать регулятор перепада давления. Эти приспособления устанавливается после насоса, но до инжектора, что искусственно создаёт перепад давления, достаточный для надёжного срабатывания контрольных клапанов. Такие регуляторы весьма полезны и предоставляют большую свободу манёвра, так как с их помощью легко установить нужный перепад давления.

Если хроматограф для ВЭЖХ часто переводят с обращённо-фазных на нормально-фазные разделения и наоборот, на шариках обратных клапанов может осаждаться налёт (впрочем, это может происходить и при обычной работе, особенно если используются модификаторы подвижной фазы). Если это происходит, обратные клапаны нужно чистить или заменять. После замены клапана, прежде чем установить его обратно в хроматограф, убедитесь, что клапан надлежащим образом заполнен подвижной фазой (т.е. из него откачан воздух).

Для тщательной чистки бывших в употреблении обратных клапанов выполните следующие действия.

1. Погрузите клапан в изопропиловый спирт и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.
2. Замените изопропиловый спирт на дихлорметан и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.

3. Замените дихлорметан на гексан и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.
4. Замените гексан на дихлорметан и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.
5. Замените дихлорметан на изопропиловый спирт и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.
6. Замените изопропиловый спирт водой и обрабатывайте в ультразвуковой бане от 5 до 10 минут.
7. Промойте водой, затем метанолом, затем просушите.

Если используются подвижные фазы на водной основе с высоким уровнем содержания соли, перед операцией 1 следует обработать обратный клапан в ультразвуковой бане в слабом растворе кислоты (например, 1-молярном растворе азотной кислоты). Перед обработкой проверьте, допустимо ли использование всех перечисленных веществ по техническим условиям изготовителя. Если нет, изготовитель должен предоставить другой порядок очистки, которого и нужно будет придерживаться.

3.1.Г.2. Растворители обладающие высокой вязкостью

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 9. **В ходе градиентного опыта достигается предельно допустимое значение давления, что приводит к отключению насоса**. Начальное значение давления не так уж и высоко, но при работе ночью хроматограф постоянно отключается.

УСТРАНЕНИЕ. Чаще всего это случается при использовании смесей спиртов с водой в соотношении объёмных долей от 5:95 до 69:40. В этих случаях на работе хроматографа отрицательно сказываются два фактора: изменение состава смеси растворителей и изменение температуры. Например, если используется метанол, вязкость подвижной фазы от примерно 1,1 МПа·с (1,1 сП) до почти 1,7 МПа·с (1,7 сП). Если в начале опыта давление в системе составляет 12,4 МПа (1800 фс/дюйм^2), при содержании метанола около 35 % достигается максимальный перепад давления, составляющий 19,3 МПа (2800 фс/дюйм^2) (12,4 x 1,7/1,1). Если же начальное давление составляет 13,4 МПа (1950 фс/дюйм^2), максимальная его величина превышает 20,7 МПа (3000 фс/дюйм^2). Если выставленное предельно допустимое значение давления в хроматографе составляет 20,7 МПа (3000 фс/дюйм^2), на ходе обычного опыта это не скажется, но даже, на первый взгляд, не принципиально увеличенный начальный перепад давления во втором случае приведёт к остановке системы в середине эксперимента.

Сказывается также то, что вязкость повышается при понижении температуры, а ночью температуры в лаборатории зачастую ниже, чем днём, на

2–5 °C. Отсюда нетрудно заключить, что даже небольшие изменения в режиме работы хроматографа могут сильно ухудшить его показатели. Чтобы исключить этот недостаток, нужно принять следующие меры. Во-первых, если колонка и остальные компоненты хроматографа это допускают, увеличить предельно допустимое давление насоса. Во-вторых, очистить колонку посредством обращения потока элюента*, чтобы удалить всё, что препятствует прохождению растворителя, а значит, вызывает повышение перепада давления. Наконец, в-третьих, термостатировать хроматограф, чтобы исключить влияние перепадов температуры в помещении.

Если аварийное отключение имеет место при разработке, оптимизации или модификации методики, рассмотрите следующие возможности избежать этого.

1. Снизить расход.
2. Использовать колонку, перепад давления на которой меньше (т.е. меньшей длины или с набивкой с бóльшим диаметром частиц).
3. Повысить температуру в хроматографе, чтобы уменьшить вязкость растворителя.
4. Сменить растворитель на менее вязкий.
5. Попытаться провести разделение в изократическом режиме.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ PC 10. **Компоненты хроматографа подвергаются коррозии или иным видам разрушения и требуют частой замены**. В установке для ВЭЖХ чаще всего соприкасаются с растворителями три материала: фторопласт (политетрафторэтилен), ПЭЭК и нержавеющая сталь. Фторопласт обычно не подвержен никаким химическим воздействиям растворителей, чего нельзя сказать о ПЭЭК и нержавеющей стали.

УСТРАНЕНИЕ. Хотя материалы на основе ПЭЭК непрерывно совершенствуются, использовать их с растворителями для нормально-фазной хроматографии по-прежнему не рекомендуется. К тому же, ТГФ весьма агрессивен, а ацетонитрил проявляет заметную агрессивность по отношению к ПЭЭК. Слабые кислоты, в основном, совместимы с ПЭЭК. Более подробные сведения о совместимости можно получить у изготовителя.

Нержавеющая сталь практически не разрушается под действием органических растворителем. Выполненные из неё элементы можно использовать с растворителями как для нормально-фазной, так и для обращённо-фазной хроматографии. Нержавеющая сталь также совместима с множеством орга-

* *Некоторые изготовители колонок не рекомендуют проводить эту операцию (прим. редактора).*

нических и неорганических кислот. Наиболее агрессивны по отношению к ней соляная кислота и её соли. Использование даже разбавленной (например, 1-молярного раствора) HCl вызывает настолько сильную коррозию, что элементы хроматографа приходится часто заменять. Следует заметить, что если соляная кислота используется исключительно при пробоподготовке, т.е. в хроматограф попадает в очень малых количествах, это никак не скажется на трубопроводах, колонке и детекторе ВЭЖХ, но будет иметь разрушительные последствия для инжектора из нержавеющей стали. Поэтому настоятельно рекомендуется попытаться использовать другие кислоты – азотную, фосфорную, уксусную, трифторуксусную, даже серную, прежде чем перейти на HCl.

3.1.Д. Смешиваемость и растворимость

Термины «смешиваемость» и «растворимость» употребляются так, что у пользователя хроматографа может возникнуть неразбериха. Дадим недвусмысленные рабочие определения смешиваемых и растворимых веществ.

Смешиваемые: два компонента, которые могут смешиваться друг с другом в любых соотношениях, не образуя при этом двух отдельных фаз, называются *смешиваемыми*. Два компонента, которые при попытке смешать их образуют два отдельных слоя, называются *несмешиваемыми*.

Растворимые: компонент, присутствующий в растворителе в любом количестве, называется *растворимым* в этом растворителе. Наибольшее количество вещества А, которое может быть растворено в единичном количестве вещества Б, называется *растворимостью* А в Б.

Выражения типа «частично смешиваемое» (т.е. имеющее низкую растворимость) и «полностью растворимое» (т.е. смешиваемое) использовать не следует, поскольку они вызывают только путаницу.

Справочные материалы обычно имеют вид диаграмм смешиваемости (Приложение, табл. 9). Однако не следует ждать от этих диаграмм слишком многого. Если пара растворителей названы «несмешиваемыми», это всего лишь означает, что два компонента, будучи смешанными в определённом соотношении, образуют двухфазную систему. Это не значит, что указанные компоненты взаимно нерастворимы до такой степени, что это может быть полезно (или вредно) для целей хроматографии. Например, дихлорметан и вода во многих пропорциях образуют двухфазную систему, то есть не смешиваются друг с другом. Однако дихлорметан растворим в воде в количестве до 1,6 %, а вода – в дихлорметане в количестве до 0,2 %.

Во многих опытах по разделению в градиентном режиме фактором, ограничивающим выбор состава растворителя, чаще всего является растворимость органического растворителя в воде. В соответствии с табл. 9 Приложения, почти 65 % растворителей (17 из 26) не смешиваются с водой. С другой стороны, почти 40 % несмешиваемых с водой веществ имеют достаточную растворимость, чтобы быть использованными в ЖХ: метилэтилкетон – 24 %, этилацетат – 9 %, 1-бутанол – 8 %, этиловый эфир – 7 %, метил-*трет*-бутиловый эфир – 5 %. При использовании растворителя, который сам по себе смешивается с каждым компонентом из пары несмешиваемых друг с другом растворителей, зачастую получаются однофазные трёхкомпонентные смеси. Это даёт хроматографисту дополнительные возможности выбора подвижной фазы.

Растворимость веществ сильно зависит от температуры, что следует обязательно учитывать, если состав элюента близок к пределу растворимости одного из компонентов. Этот фактор становится ещё более важным, если процесс смешения растворителей имеет выраженный экзотермический (как, например, метанола и воды) или эндотермический (как ацетонитрил и вода) характер и окончательную концентрацию получают доведением до определенного объёма. Если, к примеру, процесс смешения экзотермический, смесь растворителей, кажущаяся смешиваемой, после остывания до комнатной температуры может разделиться на две фазы. Этого можно избежать и получить смеси растворителей с более точно выдержанным требуемым составом, если отмерять по отдельности объёмы каждого из компонентов подвижной фазы (соответствующие содержанию ниже предела растворимости), смешивать и выдерживать их до уравновешивания температуры. Обратите внимание также на то, что изменения температуры приводят к значительным изменениям объёма. Следовательно, при приготовлении подвижной фазы никогда не удаётся получить точное соотношение объёмов в один приём, а только путём последующего небольшого разбавления (т.е. добавления того или иного компонента в малых количествах) по достижении комнатной температуры.

Влиянием температуры можно пренебречь, если система растворитель-колонка находится в условиях регулируемой температуры. Если же работа ведётся без термостатирования, будьте уверены, что когда в разгар эксперимента в помещении включится кондиционер и температура в помещении лаборатории упадёт, элюент расслоится на две фазы. Чтобы элюент всегда оставался однофазным, используйте концентрации по крайней мере на 1 % ниже предела растворимости.

Ещё одна возможность избежать нежелательного разделения фаз – приготовить смесь растворителей, насыщенную по одному из компонентов.

Например, гексан, насыщенный водой, хранят под слоем воды при непрерывном перемешивании, так что гексан всегда остаётся в насыщенном водой состоянии. К сожалению, растворимость остаётся температурно-зависимой, поэтому, чтобы обеспечить постоянство и воспроизводимость результатов хроматографического анализа, систему растворитель-колонка всё равно необходимо термостатировать. Кроме того, входной фильтр должен находиться *выше* слоя воды (вода в данном случае находится снизу, поскольку её плотность выше, чем у гексана).

В практике обращённо-фазной хроматографии буферы используют повсеместно. Следовательно, крайне важно знать растворимость каждого из компонентов буфера в подвижной фазе. Возьмём, к примеру, буфер для подвижной фазы ацетонитрил-вода на основе фосфорной кислоты и ряда соответствующих сопряжённых пар кислота-основание. Поглощение фосфатами УФ излучения пренебрежимо мало, эти вещества не денатурируют белок и могут эффективно использоваться как буферы при pH около 2, около 7 и около 12. Именно эти свойства делают фосфатные буферы столь привлекательными для множества разделений в ЖХ.

Как уже было сказано, ацетонитрил очень широко используется в обращённо-фазной хроматографии, поэтому зачастую в процессе приготовления буфера необходимо приготовить водный раствор фосфата, профильтровать его и добавить к ацетонитрилу, получая таким образом элюент для работы. Пара ацетонитрил-фосфат выбрана, чтобы проиллюстрировать следующее положение. Когда объёмная доля ацетонитрила становится больше 50 %, а уровень фосфатного буфера приближается к 50 мМ (эта концентрация снижается по мере изменения заряда буфера от $H_2PO_4^-$ через HPO_4^{-2} к PO_4^{-3}), весьма вероятно выпадение осадка. Важнее всего здесь то, что влияние осадка может проявиться не сразу. По сути, хроматографист в данном случае приготовил превосходный раствор для рекристаллизации, так что на компонентах хроматографа будут медленно нарастать кристаллы. Подвижную фазу начинают использовать прежде, чем что-либо успевают заметить. Через какое-то время дно резервуара с растворителем покрывает белый осадок. Раз осадок есть там, он есть и в головке насоса, что вызывает быстрое истирание поршня и поршневых колец; на фриттах колонки, что препятствует прохождению подвижной фазы; на сорбенте, где он забивает поры и изменяет структуру поверхности. Итак, состав буфера, его концентрация, заряд и состав растворителя – важнейшие параметры, которые обязательно следует принимать в расчёт при приготовлении подвижных фаз. При переходе на новый состав буфера, изменении его концентрации или значений pH растворителя всегда следует готовить растворитель на сутки раньше, чем он будет использоваться. Зачастую смесь оставляют на ночь

для уравновешивания. Это – предосторожность, позволяющая заметить, что образуется осадок, раньше, чем растворитель попадёт в хроматограф для ВЭЖХ. Заметим, что осадок может быть очень мелкодисперсным и иметься в небольшом количестве, так что единственная возможность его обнаружить будет состоять в том, чтобы вращать резервуар с растворителем и при этом внимательно наблюдать за его дном.

Если осадок выпадает в компонентах системы хроматографа, удалить его крайне трудно. Чтобы промыть установку от осадка, следует приготовить подвижную фазу того же состава, что был использован с буфером, но саму буферную смесь в раствор не вводить. Поскольку входная фритта колонки и набивка имеют большую площадь, больше всего осадка выпадает в начале колонки. Чтобы удалить осадок наиболее эффективным способом, подключите колонку в обратном направлении [*]. По мере растворения осаждённого вещества, оно немедленно вымывается из колонки. Разумеется, элюат следует не подавать на детектор, а сразу сбрасывать в ёмкость для отходов. Элюент не содержащий буфера, рекомендуется прокачивать через колонку до достижения равновесного состояния.

Затем систему следует промывать элюентом такого состава, при котором заведомо не будет образовываться осадок, при небольшой скорости потока и, как правило, несколько часов подряд. Например, чтобы удалить фосфаты из колонки C_{18}, можно использовать элюент на основе малого количества трифторуксусной кислоты (ТФК), дополнительно содержащий среднее количество метанола (например, вода-метанол-ТФК в соотношении объёмных долей 80:20:1). ТФК способствует отщеплению от фосфатов протонов и переходу фосфатов в растворимую форму, а метанол смачивает поверхность сорбента. Если приготовить достаточно большое количество растворителя для промывки (чтобы концентрация повторно растворённых фосфатов оставалась очень низкой), раствор можно регенерировать. К сожалению, даже очень продолжительная промывка не позволяет полностью восстановить изначальные характеристики колонки.

К такого рода воздействиям оказывается ещё более неустойчивой система, работающая в градиентном режиме, в котором элюенты А и Б могут применяются с буферами различного состава, что может привести к выпадению осадка или разделению фаз в ходе градиентного опыта. Если содержание любого из компонентов подвижной фазы в смесителе или колонке превысит концентрацию насыщенного раствора, начнётся выпадение осад-

---

[*] *Некоторые изготовители колонок не рекомендуют проводить эту операцию (прим. редактора).*

ка или разделение фаз. Здесь важно помнить, что составы смесей веществ, адсорбированных неподвижной фазой колонки, и растворенных в подвижной фазе не обязательно совпадают. Обычно адсорбированный слой обогащён компонентами растворителя, наиболее сходными по составу с набивкой.

Перевод образованных в колонке эмульсий обратно в однофазную систему занимает много времени, но обычно возможен, если использовать универсальный растворитель (например, ацетон или изопропиловый спирт). Как уже было упомянуто выше, для выпавших в осадок твердых веществ, вернуть их в растворимую форму в лучшем случае затруднительно, а чаще – невозможно, особенно если осадок попал или образовался в порах набивки или материале фритты.

Чтобы исключить нарушения работы хроматографа, связанные с растворимостью, рекомендуется взять за правило готовить подвижные фазы, по меньшей мере, за сутки до использования. В этом случае достигается равновесное состояние, и если происходит разделение фаз, это легко заметить. Если же никаких признаков осадка или нескольких фаз не наблюдается, это свидетельствует в пользу применимости приготовленной смеси.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ РС 11. **В хроматограф введены несмешиваемые растворители**. В этом случае наблюдается сильный шум нулевой линии, затем может увеличиться перепад давления, вплоть до аварийного отключения системы. На рис. 3.10 показана хроматограмма, полученная в градиентном режиме, когда в подвижную фазу ацетонитрил-вода случайно ввели смесь гексана с этилацетатом. Первым признаком ошибки является неустойчивость нулевой линии. Затем на хроматограмме появляются хаотически расположенные всплески, когда из колонки выходят капли гексана.

Хроматограмма, однако, не отображает сопутствующего повышения давления. Гексан, в конце концов, образует несмешиваемую пробку в начале колонки. По мере образования пробки поток растворителя через колонку теряет устойчивость, а когда пробка полностью сформирована – вообще прекращается. В этот момент перепад давления в хроматографе превышает предельно допустимый. То же самое происходит, если несмешиваемый растворитель систематически заносится в колонку с пробами. В этом случае ухудшение происходит медленно – со скоростью, зависящей от объёма вводимых проб и степени растворимости растворителя, используемого при пробоподготовке.

УСТРАНЕНИЕ. Проще всего избежать этой ошибки, сверяясь с диаграммами смешиваемости на предмет совместимости растворителей.

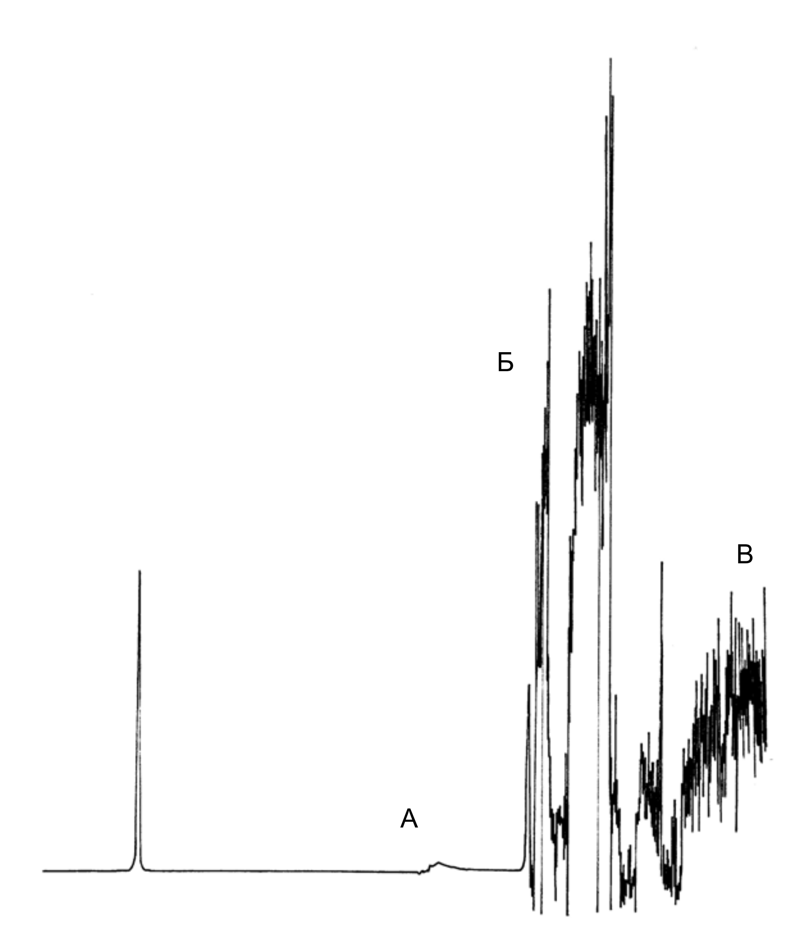


Рис. 3.10. Хроматограмма иллюстрирующая случайное смешение элюента для обращённо-фазной ВЭЖХ (ацетонитрил–вода) с несмешиваемым с ним элюентом для нормально-фазной ВЭЖХ (гексан–этилацетат) в градиентном режиме. В точке А детектора достигает небольшое количество смеси гексан–этилацетат. В этой части градиентного опыта элюенты ещё остаются смешиваемыми, но на нулевой линии явственно проявляется помеха. В точке Б превзойдён предел растворимости. Шум нулевой линии резко возрастает, поскольку теперь в детектор попадают глобулы смеси гексан–этилацетат. Между точками А и Б постоянно повышается перепад давления. В точке В давление достигает предельно допустимое значение, происходит аварийное отключение насоса. Если несмешиваемым является растворитель, использованный при пробоподготовке, ввод каждой очередной пробы приводит к дальнейшему повышению шума нулевой линии и перепада давления.

Несмешиваемость говорит не столько о невозможности использования данного вещества, сколько о необходимости дальнейшего тщательного изучения пределов растворимости.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 12. **Несовпадение состава растворителя пробы и элюента**. Проявляется как при использовании проверенных методик, так и при вводе последовательно ряда проб в процессе разработки методики, в виде изменения формы пиков, времён удерживания и количественных результатов.

УСТРАНЕНИЕ. Как следует из литературы, в этом случае целесообразным решением будут попытки вводить пробу, растворённую как в более сильном, так и в более слабом элюентах. Во многих случаях применение несовпадающих элюента в подвижной фазе и растворителя для пробоподготовки не нарушает нормальную работу хроматографа. Вместе с тем, в десятках публикаций указывается, что использование для пробоподготовки растворителя, более сильного или более слабого, чем подвижная фаза, может нарушить разделение [3]. Напрашивается общий вывод: использовать для ввода пробы растворитель, отличный от подвижной фазы,– значит создавать почву для неприятностей. И лишь в некоторых случаях этот эффект не проявляется.

Примеры проявления несовпадения составов растворителей и элюентов иллюстрирует рис. 3.11. В опыте (рис. 3.11 А) были приготовлены пробы салициловой кислоты в подвижной фазе и в чистом метаноле. Эти пробы по отдельности введены в хроматограф, где в качестве подвижной фазы использована смесь метанола, воды и ТФК в соотношении объёмных долей 40:60:0,2. Вторая проба даёт пик плохой формы, а проба, приготовленная на подвижной фазе,– очень хороший хроматографический пик. Следует обратить также внимание на большой пик в момент выхода неудерживаемого вещества, также обусловленный несовпадением растворителя и элюента. То же самое происходит и с многокомпонентными пробами. На рис. 3.11 Б пробы, содержащие метилпарабен, 2-феноксиэтанол и салициловую кислоту, приготовленные на подвижной фазе и метаноле, введены в хроматограф с подвижной фазой метанол-вода-ТФК в соотношении объёмных долей 75:25:0,1. Здесь при совпадении составов растворителя и элюента все три пика имеют прекрасную форму, а при использовании метанола в качестве растворителя пробы – плохую.

Очевидно, при выборе сочетания подвижной фазы и растворителя для пробоподготовки могут возникнуть три варианта. Пробу можно готовить в более сильном, чем подвижная фаза, элюенте, собственно подвижной фазе и более слабом элюенте. Поводом для использования растворителя, отличного по составу от подвижной фазы, может быть низкая растворимость пробы. Более сильный растворитель применяют, чтобы повысить растворимость пробы.

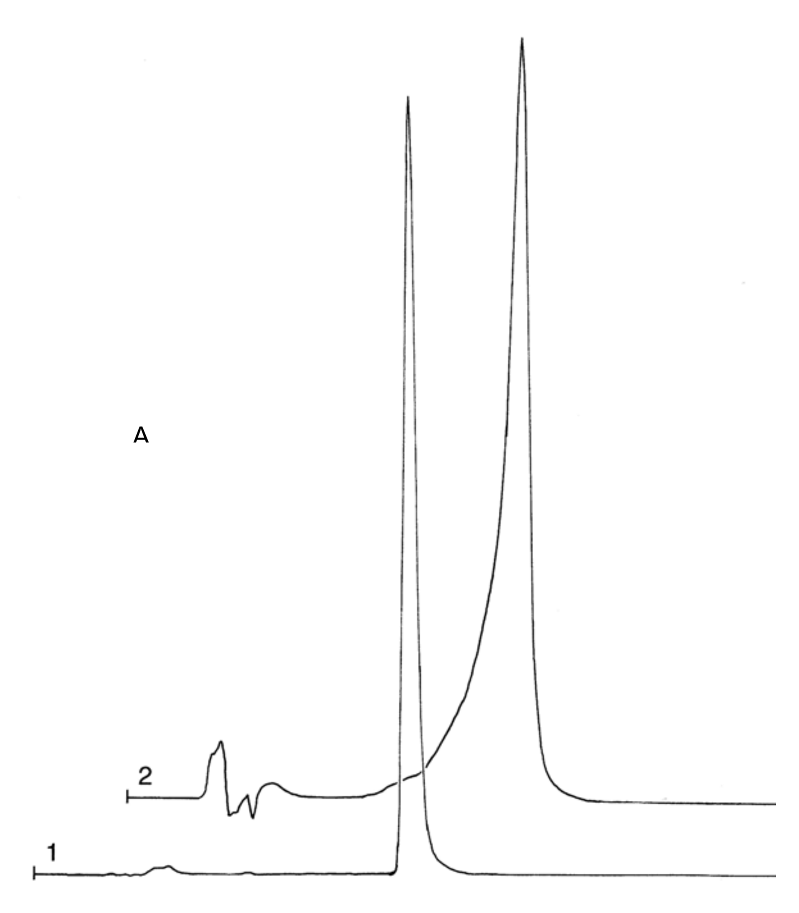


Рис. 3.11. (А) Хроматограмма пробы салициловой кислоты растворенной в подвижной фазе (кривая 1) и метаноле (кривая 2) (продолжение на следующей странице).

Когда проба попадает в хроматограф, анализируемые вещества выводятся из раствора и смешиваются с подвижной фазой. В лучшем случае, проба формируется в виде узкой зоны в начале колонки. Если повторное растворение пробы протекает быстро, получаются пики с хорошим профилем. Если определяемые вещества выводятся из растворителя, образуя несколько зон, кинетика их растворения в подвижной фазе начинает существенно влиять на время элюирования, в результате получаются неудовлетворительные пики. Профили пиков будут в этом случае зависеть также и от концентрации анализируемых веществ в пробе.

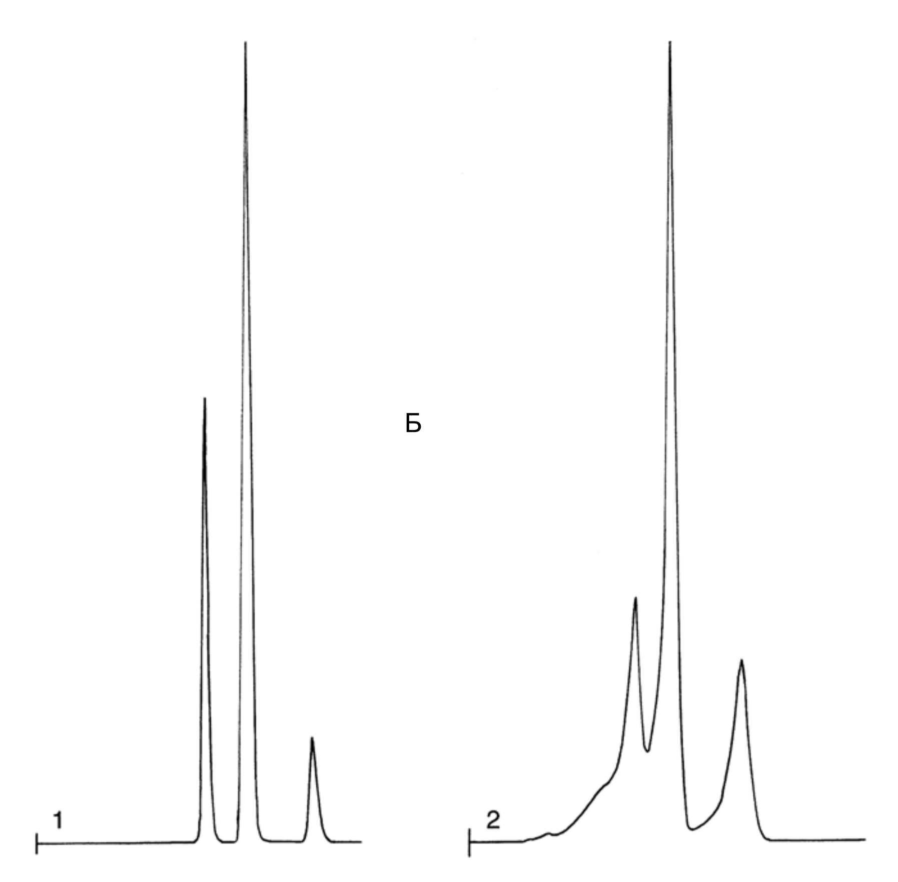


Рис. 3.11. (продолжение) (Б) Хроматограмма пробы метилпарабена, 2-феноксиэтанола и салициловой кислоты в подвижной фазе (кривая 1) и метаноле (кривая 2). Более подробно см. по тексту (продолжение на следующей странице).

К категории более сильных следует также отнести элюенты, имеющие более высокую концентрацию различных модификаторов подвижной фазы. Обычно их используют при плохой растворимости пробы. Например, если определяемые вещества находятся в матрице в виде комплексов, зачастую, чтобы высвободить их из матрицы, требуется сильный элюент. Иногда дополнительно используют буферный раствор высокой концентрации или специальные комплексообразующие реактивы. Однако в подобных случаях определяемые вещества переходят в форму соли, а из-за этого разделение

может стать крайне чувствительным к концентрации анализируемого вещества, типу и концентрации буфера и составу подвижной фазы.

В некоторых специфических случаях разделения целесообразно использовать для пробоподготовки растворители, более слабые, чем подвижная

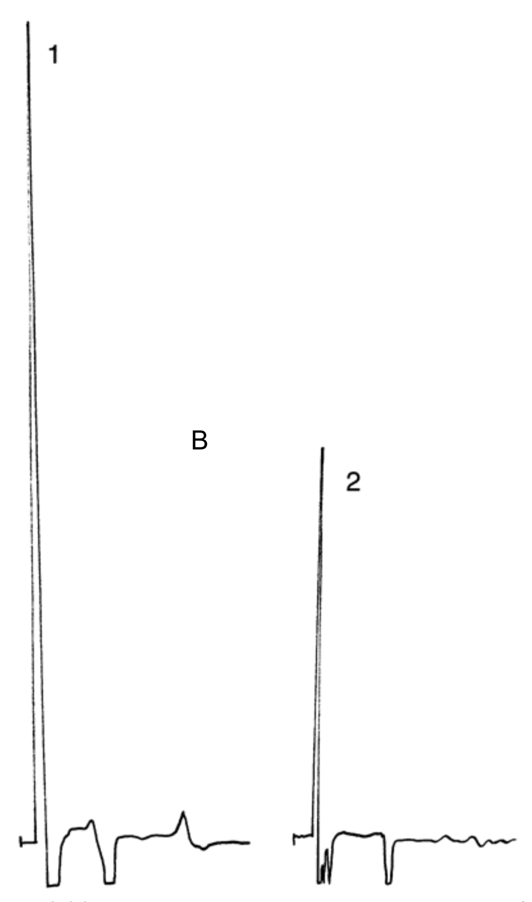


Рис. 3.11. (продолжение) (В) Хроматограмма на которой присутствуют пики, обусловленные несовпадением состава растворителей. Такие явления могут также иметь место при использовании в составе подвижной фазы и при пробоподготовке растворителей от разных производителей. Обычно времена выхода пиков, обусловленных этими причинами близко ко времени выхода неудерживаемого вещества. Две хроматограммы соответствуют пробе ацетонитрила, введённой в подвижные фазы ацетонитрил-вода в соотношении объёмных долей 50:50, в которых использованы растворители от разных изготовителей. Длина волны детектора составляла 210 нм.

фаза. Предполагается, что при этом будет получен более острый пик, благодаря «резкому градиенту» при вводе пробы, приготовленной на слабом растворителе. Естественно, при этом система становится очень чувствительной к концентрации определяемых веществ, кроме того, здесь могут сказываться и любые изменения объёма пробы.

К категории более слабых следует также отнести элюенты, имеющие более низкую концентрацию модификаторов подвижной фазы или вовсе не содержащие модификаторов. Использование таких элюентов обычно обусловлено ограничениями, налагаемыми на некоторых этапах пробоподготовки, оно также часто встречается в ион-парной хроматографии. Чаще всего более слабые элюенты применяют, чтобы избежать растворения ненужных составляющих матрицы, т.е., чтобы получить более чистую хроматограмму. Однако в таких случаях анализируемые вещества должны находиться в несвязанной форме. Чтобы разделение было воспроизводимым, после ввода пробы в подвижную фазу, содержащую модификатор, равновесие между подвижной фазой и определяемым веществом должно устанавливаться очень быстро. Обычно так и происходит, если концентрация анализируемого вещества значительно меньше, чем концентрация модификатора; при этом получаются хроматограммы хорошего качества.

При рассмотрении вопросов, связанных с несовпадением состава элюента и растворителя пробы, часто забывают о возможности получения пиков, вызванных самой хроматографической системой. В процессе некоторых разделений эти (системные) пики могут выходить одновременно с пиками анализируемых веществ, при этом последние будут иметь странную форму или необычную площадь (слишком большую или слишком малую). Чтобы как следует оценить влияние несовпадения составов на качество разделения, нужно ввести *холостую* (не содержащую анализируемых веществ) пробу растворителя, используемого для пробоподготовки, и получить соответствующую хроматограмму. Если на ней не наблюдается ни пиков, ни возмущений нулевой линии, то несовпадение составов не будет чревато никакими ошибками (см. рис. 3.11 В). Окончательный вывод состоит в том, чтобы, по возможности, избегать несовпадения составов элюентов и растворителей, и применять для пробоподготовки подвижную фазу, используемую для разделения.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 13. **Осаждение солей на головке насоса, обратных клапанах, фитингах соединительных трубопроводов, детекторах и пр.** Когда в составе подвижной фазы имеются соли для формирования буферных или ион-парных систем, в хроматографе происходит то же, что в любом резервуаре для солевых растворов: *высаливание*. Отложения представляют собой засохший буфер в точках небольших утечек под-

вижной фазы; это непосредственное проявление процесса кристаллизации (рис. 3.12). Обычно высаливание происходит за несколько недель и не сразу заметно.

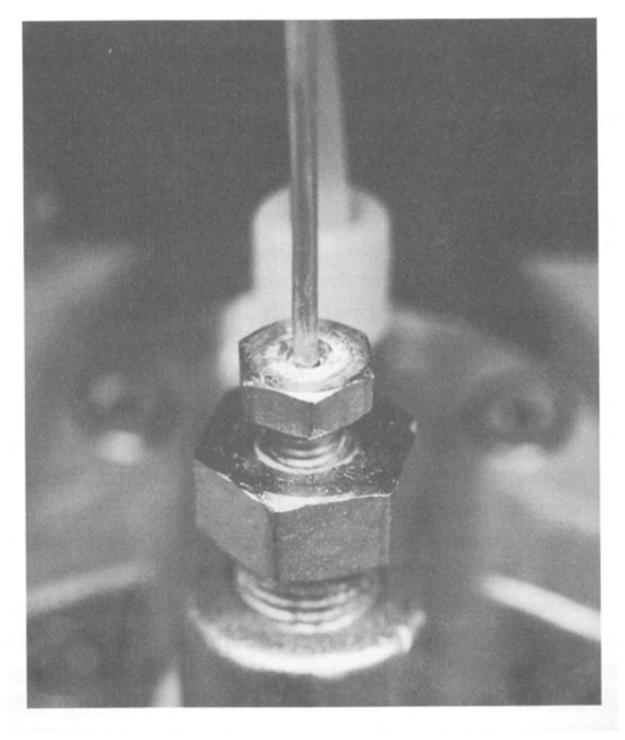


Рис. 3.12. Белый налёт в верхней части обратного клапана на выходе образуется в результате осаждения твёрдого вещества – *кристаллизации*.

УСТРАНЕНИЕ. Осаждение солей вокруг плунжера насоса, на обратных клапанах, колонке, в детекторе приводит к значительным, иногда неустранимым повреждениям. Чтобы избежать этого, следует, по возможности, использовать неосаждающиеся модификаторы подвижной фазы. Примерами таких веществ являются трифторуксусная кислота (ТФК) и триэтиламин.

Если же соли, все-таки используются, хроматограф необходимо периодически промывать соответствующе й совместимой подвижной фазой, не содержащей солей. Хотя это рекомендуется делать даже после остановки на ночь, особенно важно не забывать о промывании, если хроматограф

выводится из работы на длительный срок. Если предполагается, что хроматограф не будет работать короткое время (например, ночью), вместо промывания можно оставить слабую подачу подвижной фазы. При этом растворитель можно затем регенерировать, чтобы избежать больших его потерь.

Аналогичным образом надлежит вымывать соли из колонок перед передачей их на хранение. Чаще всего колонки для обращённо-фазной хроматографии промывают смесями ацетонитрила или метанола с водой. Для нормально-фазной хроматографии обычно используют изооктан (гораздо менее летучий, чем гексан). Ионообменные колонки, как правило, требуют хранения в слабых (т.е., ионных) солевых растворах. Если нет точной уверенности, обратитесь к инструкции по эксплуатации фирмы-изготовителя – все изготовители колонок рекомендуют те или иные растворителя для длительного хранения.

Для систем, где уже появились признаки осаждения солей, необходимо устранить места их появления, где только это возможно, прежде чем подать в систему элюент. Это особенно существенно для насосов. Обратные клапаны, головку насоса и плунжер, возможно, придётся демонтировать, разобрать и очистить отдельно каждую деталь. Сведения о совместимости растворителя с кислотами обычно содержатся в документации изготовителя прибора. Если их не окажется, используйте для очистки слабый водный раствор кислоты, затем кислый раствор в метаноле, наконец, чистую воду. Для удаления воды и ускорения сушки выполните заключительную промывку чистым метанолом. Обработка ультразвуком на некоторых или всех этапах очистки может ускорить процесс удаления солей. Повторная сборка системы производится после полного высушивания деталей.

Если колонки хранились с солевыми растворами, и появились явные признаки осаждения солей, их дальнейшая эксплуатация, скорее всего, невозможна. Если известно, какой элюент был использован при хранении, попытайтесь промыть колонку при небольшом расходе свежеприготовленным раствором, подобранным в соответствии с этим элюентом. Внимательно следите за перепадом давления. Если он увеличивается, возможно, частично засорились фритты; тогда их следует снять и очистить или заменить. При этом желательно осмотреть сорбент в колонке на предмет видимых признаков высаливания или изменения цвета. Если в колонке заметны кристаллические отложения, скорее всего, она уже не подлежит восстановлению.

Появление на набивке участков от жёлтого до коричневого цвета (отличного от цвета самой набивки) говорит об органических отложениях.

Они накапливаются с течением времени вследствие наличия в элюенте или пробах высокомолекулярных (или слаборастворимых) соединений. Обратная промывка может оказаться или не оказаться эффективной, особенно, если сорбент в колонке высох. Чтобы предотвратить органические отложения в колонке, лучше всего периодически пускать поток в обратном направлении * и промывать колонку сильным растворителем (например, смесью изопропилового спирта, воды и ТФК в соотношении объёмных долей 70:30:1).

Если изначально очистка колонки не потребовалась, колонку можно подключить к насосу и пропускать элюент с малой скоростью. При этом состав элюента должен быть таким, чтобы он хорошо растворял соли, например, смесь с большой долей воды (вода с метанолом в соотношении объёмных долей 80:20), с кислым модификатором (например, 0,5 % трифторуксусной кислоты). При этом следует следить за перепадом давления на колонке. Если его значение превышает 150 % от номинального, возможно, колонка повреждена необратимо из-за засорения пор сорбента и межзёренных путей потока. Если перепад давления окажется в приемлемых пределах, колонку необходимо промыть элюентом объёмом, составляющим 10 – 20 её объёмов, затем провести испытания на эффективность.

Как упоминалось выше, формирование кристаллов в колонке приводит к тому, что большая часть пор может быть закупорена. Засорение пор не обязательно проявляется в повышении перепада давления на колонке. Однако эффективность колонки при этом снижается, поскольку активная поверхность сорбента приходится в основном на поры. Поэтому единственный способ точно оценить эффективность колонки – это провести анализ смеси известного состава.

Хуже всего, когда на колонке явственно заметны признаки появления солей, но ничего не известно о том, что за вещество в ней оставалось. В подобных случаях чаще всего восстановить колонку не удаётся. Если предполагается, что колонку в последний раз использовали в обращённо-фазном режиме, можно попробовать растворить соли, как указывалось выше, смесью воды, метанола и ТФК в соотношении объёмных долей примерно 80:20:0,5.

Наконец, не следует забывать, что солевые отложения могут образовываться и в соединительных трубопроводах. Если вокруг соответствующих

---

* *Некоторые изготовители колонок не рекомендуют проводить эту операцию (прим. редактора).*

фитингов наблюдается появление солей, разумнее всего будет заменить соответствующие участки соединительных капилляров.

3.1.Е. Неустойчивость и реакционная активность растворителей

Некоторым группам растворителей присуща неустойчивость. Окончательные и промежуточные продукты их разложения могут быть химически активны или изменять хроматографические свойства элюента в заметной для хроматографиста степени. Проиллюстрируем далее это положение на двух группах растворителей (эфиры и хлорированные парафины) и двух отдельных растворителях (вода и ацетон).

Если возникают вопросы по поводу устойчивости растворителей, можно обратиться к ряду инструкций по технике безопасности [4, 5] или непосредственно к рекомендациям фирмы-производителя растворителя.

3.1.Е.1. Эфиры. Как уже говорилось, циклический эфир тетрагидрофуран (ТГФ) активно образует перекиси. Это – общее свойство эфиров, у которых в структуре есть вторичные или третичные атомы водорода в альфа-положении. Соответственно, этиловый эфир и ТГФ должны активно образовывать перекиси (что и наблюдается), а метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ) не должен (что также соответствует действительности).

Обычно эфиры хранят в атмосфере сухого азота, чтобы предохранить от попадания воды и кислорода, которые, как установлено, способствуют образованию перекисей. Изготовители часто добавляют к перекисеобразующим эфирам консерванты. Например, к ТГФ добавляют в качестве консерванта 250 млн$^{-1}$ БГТ.

Перекиси имеют высокую химическую активность и являются сильными окислителями. Об этом следует помнить всегда, когда появляется необходимость применения эфиров. При этом должны учитываться возможные реакции аналитов с перекисями в хроматографической системе. Разумеется, следует избегать использование неустойчивых эфиров, если анализируемые вещества легко окисляются или вступают в химические реакции с перекисями.

Ещё одна часть хроматографической системы, подверженная реакциям с перекисями, – это сорбент. Хотя его обычно считают инертным, на самом деле привитая фаза может необратимо изменяться вследствие реакции с перекисями. Как аминопропильная, так и диольная фазы, привитые к силикагелевой основе, подвергаются химическим изменениям при взаимодействии с перекисями в обычных условиях опыта. Полимерные основы,

например полистирол-дивинилбензол, также реагируют с перекисями. В любом случае следует избегать применения эфиров с такими сорбентами или, по крайней мере, строго соблюдать предписанные составы элюентов.

Случай использования этилового эфира является интересным с исторической точки зрения. Несколько десятков лет назад химики предположили, что добавление этанола в этиловый эфир затормаживает образование перекисей в нем. Поэтому этанол в количестве около 2 % (объёмная доля) стали использовать как стабилизатор. Именно на основе такого эфира и строились многочисленные элюенты для экстракции и разделения. Однако впоследствии было установлено, что этанол не столь уж эффективно ингибирует образование перекисей или удаляет их. Тем не менее, попытки прекратить добавлять этанол в этиловый эфир встретили сопротивление, поскольку хроматографические характеристики такого стабилизированного эфира существенно отличаются от характеристик нестабилизированного. В настоящее время активно используют как стабилизированный, так и нестабилизированный этиловый эфир, при этом в методиках обязательно указывается, какой именно эфир следует использовать.

С точки зрения техники безопасности эфиры мало чем отличаются от других химикатов – обращаться с ними нужно всегда осторожно, а утилизировать по определённым правилам. Однако образование перекисей требует особых мер. Обычно перекиси не видны невооружённым глазом. Даже если изготовитель гарантирует на упаковке содержание перекисей менее 1 млн$^{-1}$, и растворитель поставляется в сосудах в атмосфере азота, неправильное его хранение при транспортировке или складировании может привести к нарушению целостности упаковки. Если крышка сосуда утрачивает герметичность, в сосуд проникает воздух, что приводит к ускоренному образованию перекисей. Также способствуют образованию перекисей хранение растворителя при повышенной температуре и под воздействием света. Поскольку хроматографист почти или совсем не может повлиять на условия хранения растворителей вне лаборатории, следует проверять эфиры на содержание перекисей до их использования.

Чтобы помочь избежать ошибок, связанных с неустойчивостью растворителей, изготовители зачастую печатают на этикетках срок годности, так что хроматографисту легко определить, не утратил ли уже или не начал ли утрачивать растворитель своих свойств. Впрочем, это не более, чем подсказка, поскольку неправильные условия при хранении (например, повышенная температура или прямой солнечный свет) могут значительно ускорить разрушение растворителя.

Чтобы уменьшить риск при использовании перекисеобразующих растворителей и снизить вредное воздействие образования перекисей, обращайте особое внимание на сроки годности. Запас таких растворителей в лаборатории должен постоянно обновляться и никогда не превышать трёхмесячный срок. Чтоб замедлить образование перекисей, ТГФ и любые другие перекисеобразующие растворители необходимо хранить в холодном сухом помещении, защищённом от солнечных лучей. Для контроля содержания перекисей обычно используют два колориметрических испытания. Это быстрые качественные испытания с использованием иодида калия [6, 7]:

- берут около 1 мл образца испытуемого эфира, смешивают с равным объёмом ледяной уксусной кислоты, содержащей около 0,1 KI и интенсивно взбалтывают; или
- добавляют 1 мл свежеприготовленного 10 %-ного раствора KI в 10 мл испытуемого эфира и интенсивно взбалтывают.

Окисление иодида (бесцветного) до трииодида (жёлто-коричневого) свидетельствует о наличии перекисей. Интенсивность окраски позволяет судить об их содержании. Едва заметный желтоватый оттенок говорит об очень малом содержании перекисей, а коричневая окраска – о потенциально опасном уровне.

Зачастую качественного определения уровня перекисей достаточно, чтобы понять, пригоден ли растворитель к дальнейшему употреблению. Если необходимо количественное определение перекисей, используют спектрофотометрический метод с применением тетрахлорида титана, который позволяет определять их содержание вплоть до нескольких миллионных долей. Этот метод достаточно сложен, поэтому рекомендуем изучить его подробное описание в литературе [8].

При содержании перекисей свыше 250 млн$^{-1}$ растворитель считается взрывоопасным (ещё раз отметим, что опасными могут быть и куда меньшие содержания перекисей, например, если в процессе работы может происходить уменьшение объёма эфира). Если внутри сосуда с эфиром, на крышке или горлышке наблюдаются кристаллические отложения, *не трогайте сосуд*! Кристаллы перекисей взрываются при прикосновении. Для надлежащей утилизации вызывайте ответственного по технике безопасности.

Как уже говорилось, для повышения устойчивости этилового (иначе диэтилового) эфира и тетрагидрофурана (ТГФ) фирмы-изготовители обычно добавляют в процессе производства стабилизатор – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (БГТ), препятствующий образованию перекисей в этих растворителях (ТГФ в этом случае называют *стабилизированным* или *класса «не*

для спектрометрии»). Коэффициент поглощения БГТ в УФ диапазоне весьма высок, даже на длинах волны существенно более 280 нм, поэтому этиловый эфир и ТГФ, стабилизированные БГТ, редко используют в хроматографах с УФ детекторами.

Чаще всего стабилизированный ТГФ применяют в гель-проникающей хроматографии, когда в качестве детектора используется рефрактометр. При таком использовании поглощение БГТ в УФ-диапазоне совершенно несущественно, однако очень важным является гарантия отсутствия перекисей, которые могут сильно и необратимо повредить сорбент на полимерной основе. Кроме того, стабилизатор существенно сокращает срок хранения ТГФ. Естественно, неправильный выбор стабилизированного (не для спектрометрии) или, напротив, нестабилизированного (для УФ-спектрометрии) ТГФ может сильно сказаться как на безопасности проведения работ, так и хроматографических характеристиках растворителя.

Для стабилизации этилового эфира можно использовать этанол, чтобы избежать осложнений, связанных с применением БГТ. Содержание спирта различно у разных изготовителей (от 1 до 3 %), так что, как и в случае с хлороформом, после завершения разработки методики, целесообразно всегда использовать эфир одной и той же фирмы.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 14. **Неустойчивость эфиров.** Продукты разложения эфиров, а именно, перекиси, весьма активны химически как окислители. Они быстро реагируют с большим количеством веществ, образуя новые соединения. Эти соединения имеют уже другие параметры хроматографического удерживания, так что на хроматограмме неожиданно получаются сдвоенные пики. Окислительно-восстановительные свойства перекисей могут нежелательным образом сказаться на работе электрохимических детекторов, так что перекиси необходимо удалять до детектора.

УСТРАНЕНИЕ. Рекомендуем всегда использовать свежеприготовленные вещества. Здесь «свежеприготовленные» означает вещества, хранящиеся надлежащим образом (в прохладном, сухом и тёмном месте) и используемые в течение срока годности, указанного на этикетке. Если ёмкость с веществом вскрыта, а условия хранения не выдержаны, до использования следует провести вышеописанные испытания на содержание перекисей.

3.1.Е.2. Хлорсодержащие парафины. Из этого класса веществ в ЖХ чаще всего используются дихлорметан, хлороформ и четырёххлористый углерод. Все эти растворители, а также большинство хлорсодержащих неароматических растворителей, разрушаются в присутствии воды или света с образованием высокоактивных органических промежуточных соединений, содержащих свободные радикалы, а также соляной кислоты. Сво-

бодные радикалы реагируют с веществами с образованием других свободных радикалов и так далее, при этом образуется широкий спектр хлорсодержащих побочных веществ. Чем дольше хранится растворитель, тем больше в нём образуется таких побочных соединений, и тем более разнообразен их состав; кроме того, растворитель приобретает кислотные свойства. Соответственно, хлорсодержащие растворители, так же, как эфиры, требуют особого внимания. Сохранность растворителя обеспечивается надлежащим хранением (в прохладном, сухом и тёмном месте), своевременным обновлением запасов и определенными размерами запасов (не более, чем на 3 – 6 месяцев работы).

Поскольку хлорсодержащие растворители разрушаются очень быстро, в них практически всегда добавляют стабилизаторы, чаще всего амилен (2-метил-2-бутен) и циклогексен. Эти олефины действуют как химические поглотители, вступая в реакцию с соляной кислотой. В качестве стабилизатора использовали также циклогексан, но его эффективность сомнительна.

Четырёххлористый углерод составляет исключение, его обычно выпускают без стабилизаторов. Дело в том, что четырёххлористый углерод часто используют как апротонный растворитель для инфракрасного спектрального анализа. Количественное определение содержания масел и смазочных материалов по интенсивности ИК излучения связи С–Н может быть выполнено именно с применением четырёххлористого углерода. Добавление олефинов в качестве стабилизаторов сделает четырёххлористый углерод непригодным для этих целей.

Стабилизатор приходится добавлять в хлорсодержащие растворители из-за их естественной неустойчивости. По этой причине такие растворители, как хлороформ и метиленхлорид никогда не продаются без стабилизаторов. Как уже сказано, они обычно содержат олефин (например, амилен или циклогексен), действующий как поглотитель HCl. Содержание стабилизаторов составляет обычно от 50 до 250 млн$^{-1}$. Поскольку применяемые олефины прозрачны в УФ диапазоне и присутствуют в столь малых количествах, они обычно не создают никаких затруднений в ЖХ. Некоторые изготовители также пытались использовать циклогексан и метанол. Эффективность циклогексана оказалась сомнительной, а метанол, как очень сильный растворитель, существенно влияет на хроматографические параметры нормально-фазного разделения.

Чтобы избежать связанных с этим ошибок, следует принять две меры предосторожности. Во-первых, необходимо регулярно заменять хлорсодержащие растворители на новые и храните их запас лишь на небольшой срок (от трёх до четырёх недель работы). Во-вторых, если растворитель хранится

давно (например, три месяца и более с даты изготовления), следует выполнить испытания водной вытяжки по следующей методике [9].

1. Из экстракта растворителя с водой (1:1) отделяется слой воды.
2. Выполняются следующие действия:
   а) Проводятся испытания этого слоя при помощи лакмусовой бумаги. Если водный слой имеет сильно кислую реакцию, в хлорсодержащем растворителе повышено содержание H^+, и он, скорее всего, непригоден к употреблению.
   б) С другим аликвотным количеством из этого слоя проводятся испытания при помощи азотнокислого серебра. К 10 мл водной вытяжки прибавляется около двух капель 0,025-молярного $AgNO_3$. В тёмной комнате образец располагается напротив листа чёрной бумаги и пропускается луч света сквозь него параллельно бумаге. Если в образце заметна белая взвесь, в растворителе содержится заметное количество Cl^-, растворитель, скорее всего, непригоден к употреблению.

Если есть подозрения, что кислота содержится во всей партии растворителя, необходимо испытать *каждый сосуд* из данной партии. Соответственно, положительные результаты испытания одного сосуда из партии не дают оснований судить о пригодности всей партии. Чем больший срок прошёл от даты изготовления, тем больше вероятность ухудшения свойств растворителя.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ РС 15. **Неустойчивость хлорсодержащих растворителей.** В хлорсодержащих растворителях может образовываться заметное количество HCl. Присутствие кислоты может радикальным образом сказаться на временах удерживания и профилях пиков анализируемых веществ содержащих в своем составе лабильный водород. Кроме того, HCl весьма агрессивна по отношению к деталям из нержавеющей стали и ускоряет растворение силикагеля.

УСТРАНЕНИЕ. При использовании таких растворителей необходимо особенно тщательно подходить к их выбору (по типу и содержанию стабилизаторов). Соответствующие требования должны быть чётко прописаны в методике. Обеспечьте надлежащие условия хранения хлорсодержащих растворителей – в прохладном, сухом и тёмном месте. Используйте растворители в течение указанного на этикетке срока годности. Если сосуд с растворителем вскрыт, или есть основания предполагать ненадлежащее хранение, перед употреблением испытайте каждый сосуд отдельно на содержание кислоты.

Главный источник ошибок при использовании хлорсодержащих растворителей лежит за пределами собственно хроматографии. Чаще всего такие растворители используют для жидкостно-жидкостного экстрагирования определяемых веществ из сложной матрицы. По окончании экстрагирования концентрируют пробу испарением хлорсодержащего растворителя, однако при этом повышается и концентрация HCl в пробе. Большой разброс проб по pH может вызвать резкие изменения получаемых хроматограмм. Итак, важно внимательно относиться к выбору, а также испытаниям такого рода растворителей.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 16. **Хлороформ также выпускается промышленностью с добавкой двухкомпонентного стабилизатора – олефина *и* этанола (от 1 до 3 %).** При этом содержание этанола контролируется не очень строго. Следовательно, использование стабилизированного этанолом хлороформа в качестве растворителя для ВЭЖХ может привести к большому разбросу времён удерживания при переходе на хлороформ от других изготовителей.

УСТРАНЕНИЕ. В ЖХ лучше всего использовать исключительно хлороформ, стабилизированный только олефином, если иное прямо не предписано в методике. Если в качестве детектора используется рефрактометр, разумнее всего приобретать растворитель у какого-то одного производителя, поскольку разные фирмы используют разные стабилизаторы и применяют их в разных количествах.

Заметим также, что растворимость воды в хлорсодержащих растворителях варьирует в пределах от 80 млн$^{-1}$ (четырёххлористый углерод) до 560 млн$^{-1}$ (хлороформ) и даже 2500 млн$^{-1}$ (дихлорметан). Применение таких насыщенных водой растворителей, вполне типичных для нормально-фазной хроматографии, приводит к утрате активности наиболее часто используемых сорбентов - силикагеля или оксида алюминия. По мере увеличения количества воды, адсорбированной поверхностью силикагеля (это происходит чаще всего при возрастании содержания воды в подвижной фазе), резко уменьшается удерживание и ухудшается разрешение, поскольку молекулы воды из растворителя, поглощаясь поверхностью сорбента, занимают центры адсорбции, и он теряет свою активность.

Для уменьшения содержания воды в подвижной фазе необходимо использовать осушители, например, молекулярные сита или предколонку с силикагелем. Следует учесть, что такие осушители представляют собой прекрасные сорбенты широкого профиля и при хранении абсорбируют из воздуха воду и органические вещества. Поэтому осушители перед использованием для растворителя нужно тщательно очистить, для чего чаще

прибегают к их нагреванию. К сожалению, даже после такой очистки на молекулярных ситах остаётся заметное количество микрочастиц осушителя. Микрочастицы могут засорить фритты или колонку, вследствие чего возрастает давление в системе, а загрязнения могут изменить химические свойства сорбента и сказаться на хроматографических результатах.

Как вариант, можно поддерживать в растворителе всегда одно и то же содержание воды, при необходимости, добавляя её контролируемым образом. В некоторых случаях растворитель предварительно насыщают водой. Впрочем, и здесь разброс может быть довольно велик, поскольку растворимость зависит от температуры.

3.1.E.3. Вода. В обращённо-фазной хроматографии вода как составляющая подвижной фазы используется почти всегда. Это – самый распространённый растворитель для ЖХ. Поскольку вода, как растворитель применяется повсеместно, каждый хроматографист знаком с её свойствами и имеет опыт работы с ней. Это приводит к тому, что многие предполагают, будто использование воды не может повлечь за собой никаких или почти никаких затруднений. Такое благодушное отношение к воде для многих хроматографистов превратило их практическую работу в настоящий кошмар.

Воду очищают таким способом, чтобы удалить как органические, так и неорганические загрязнители. Если вода произведена и упакована надлежащим образом, её pH составляет около 7, она содержит весьма малые количества органических и неорганических примесей и вовсе не содержит бактерий. Многие изготовители контролируют выполнение этих условий по значению pH, малому градиенту в ЖХ с УФ детектором, высокому удельному сопротивлению и отрицательному результату микробиологических испытаний. Окончательные значение pH и содержание металлов в воде зависят не только от технологии производства, но и от упаковки и продолжительности соприкосновения с воздухом (поскольку в воде растворяется двуокись углерода). Кроме того, при длительном хранении материал сосуда может сказаться на значении pH.

Как только закрытый сосуд с водой вскрывают, туда проникают аэробные бактерии и питательные вещества для них. Бактерии начинают размножаться. Если воду не смешать с заметным количеством органического модификатора (например, ацетонитрила в количестве свыше 10 %), бактерии будут продолжать размножаться. Растворитель загрязняется живыми и мёртвыми бактериями, фрагментами клеточных оболочек, фрагментами пептидов белков самих бактерий. Когда такой раствор прокачивается через колонку для ВЭЖХ, загрязнения либо накапливаются, пока не перегрузят

колонку, после чего происходит их проскок, либо, если элюент достаточно силён, элюируются вместе с анализируемыми веществами. В любом случае на хроматограмме возникают непредвиденные и недопустимые пики, не связанные с пробой.

Обычно рост бактерий удаётся предотвратить или за счёт добавления в воду органического компонента (например, от 10 до 15 % ацетонитрила), или за счёт высокого или низкого pH (например, буфер на основе уксусной кислоты с pH < 4 или боратный буфер с pH > 8). Далее, слабый элюент в обращённо-фазном разделении, по возможности, готовят с добавлением органического растворителя, он не должен представлять собой чистую воду. Лучше, чтобы органический модификатор воды, удовлетворяющий требованиям хроматографии, содержался в самой высокой допустимой концентрации уже в резервуаре со слабым элюентом.

Значительно худшая ситуация может наступить, если бактерии проникают во все «щели и закоулки» хроматографа для ВЭЖХ. Элементы с большой площадью поверхности (например, внутренние фильтры резервуара, фритты в трубопроводах и колонке) прекрасно подходят для размножения бактерий. На хроматограмме наличие бактерий проявляется как неожиданные и невоспроизводимые пики. Устранение таких загрязнений крайне трудоёмко. Все элементы из нержавеющей стали нужно промывать слабым раствором азотной кислоты, а затем водой и метанолом (вначале следует убедиться, что все элементы жидкостного хроматографа выдерживают действие азотной кислоты. Те, что не выдерживают, необходимо очищать в соответствии с указаниями изготовителя, или заменять).

Чтобы предотвратить рост бактерий в воде, некоторые производители добавляют азид натрия. Присутствие азида сказывается на процессах ионообменной и ион-парной хроматографии, а также на работе электрохимических детекторов, которые иногда используют в этих методах. Поскольку азид натрия образует в воде ионный раствор, он может неявно, но заметно повлиять на хроматографию анализируемых веществ, содержащих лабильный протон, а также более сложных веществ, например, пептидов и белков. Кроме того, использование азида натрия сопряжено со сложностями в плане техники безопасности и производственной гигиены. В случае применения неправильных способов утилизации могут образовываться взрывоопасные азиды тяжёлых металлов (например, при соприкосновении с металлическими сантехническими изделиями, если азиды сливают в канализацию). Кроме того, азид натрия отличается сильной токсичностью и канцерогенными свойствами. Поэтому обращаться с ним нужно крайне осторожно.

Вода – растворитель, имеющий, видимо, самое большое количество классов чистоты в соответствии с задокументированными техническими условиями (ТУ). Сюда относятся ТУ таких организаций, как ACS, USP, ASTM, SEMI, а также общие ТУ, например, на воду класса «не содержащая пирогенных веществ». Весьма важно, чтобы вода, используемая в методике, соответствовала ТУ. Поскольку многие из упомянутых организаций включают в ТУ испытания, не характерные для производителей растворителей высокой чистоты для ВЭЖХ, важно запрашивать фирму-производителя всякий раз, когда возникают неясности по поводу пригодности воды для ВЭЖХ.

Если вода класса «для ЖХ» производится лабораторией самостоятельно, обязательно должны быть установлены фильтры, позволяющие обеспечить должный уровень чистоты (например, угольные, обратно-осмотические, на ионообменных смолах). Промышленность серийно выпускает множество разных установок для этой цели, так что подробный перечень требований лаборатории и описание порядка применения поможет изготовителю таких приборов подобрать нужную комплектацию (в частности, важно, в каком порядке установлены фильтры).

Необходимо провести испытания также и источника подачи воды в систему очистки. Если в ней содержится слишком много неорганических или органических примесей, возможно, придётся предусмотреть отдельную установку для предварительной обработки воды между источником и установкой для доочистки. Заметим, что вода городских станций водоочистки различается по характеристикам в зависимости от времени года, поскольку летом в неё добавляют больше обеззараживающих веществ, чем зимой.

Застойные зоны в системе водоподготовки, если они есть, представляют собой прекрасное место для размножения бактерий. Следовательно, нужно продумать рециркуляционные характеристики системы. Выходные трубопроводы должны быть изготовлены из инертного жесткого материала, например, фторопласта. Впрочем, независимо от природы материала, выходные трубопроводы, находящиеся в постоянном контакте с воздухом, могут быть источником сильных загрязнений, если их не закрывать после работы в обязательном порядке колпачками.

При использовании собственных систем водоочистки необходимо разработать и строго выполнять график регламентно-профилактических работ по замене патронов фильтров, соединительных и сливных трубопроводов, а также внедрить в системе обеспечения качества протокол поточных анализов для проверки готовой воды на чистоту.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 17. **Непредвиденные пики в обращённо-фазной хроматографии в градиентном режиме с использованием воды**. Такие явления могут проявляться по-разному. Во-первых, на хроматограммах неожиданно могут возникать новые пики, размер и времена выхода которых затем остаются неизменными. Во-вторых, изменения могут быть постепенными, размер пиков и время их выхода могут меняться (см. рис. 3.8).

УСТРАНЕНИЕ. Такого рода ошибки при использовании воды в подвижной фазе обычно возникают при переходе на новую партию воды (если её приобретают на стороне) или при приготовлении свежей подвижной фазы на основе воды собственного изготовления. Их устранение основано на том, что изменение времени выдержки перед началом градиента приводит к пропорциональному изменению размера пика загрязнителя, поскольку большее количество слабого элюента поступит в колонку.

Чтобы надлежащим образом испытать элюент, проводят ряд опытов в градиентном режиме, отличающихся только выдержкой перед началом градиента. Обычно количество таких опытов не меньше *трёх*, причём первые два – в идентичных условиях. Первый опыт используется для промывания и уравновешивания системы, второй и третий – для получения результатов к сопоставлению. Если размеры пика на хроматограммах в этих опытах совпадают, источником загрязнения является не слабый элюент. Если же размер пика возрастает при увеличении времени выдержки, причина ошибки – один из компонентов слабого элюента. Если загрязнитель поступает с водой, следует взять новую бутыль или перейти к другой партии; в случае собственного изготовления воды необходимо длительно промыть установку для водоочистки, возможно, потребуется очистить или заменить фильтры или ионообменники. Помните, что при получении воды, пригодной для работы в ВЭЖХ, нужно слить из системы не менее 1–2 литров воды прежде, чем отобрать нужное её количество.

Если непредвиденные пики на хроматограммах возникают при запуске системы ВЭЖХ, которая долго не эксплуатировалась, наиболее вероятную причину этого следует искать в резервуаре для слабого элюента. В некоторых случаях в качестве слабого элюента используется чистая вода. Само по себе это не приводит к ошибкам, если только резервуар и входной фильтр хроматографа подвергаются регулярной очистке или замене. Иначе на поверхностях резервуара и фильтра нарастают колонии бактерий. В конце концов, их количество становится достаточно большим для того, чтобы и остатки и продукты жизнедеятельности проникли в хроматограф и наблюдались в виде пика или пиков. В подобных случаях требуется полная очистка резервуара и всех элементов на входе хроматографа.

Чтобы избежать этой ошибки, лучше всего, чтобы водный раствор содержал антибактериальное вещество (азид натрия, однако см. выше соображения безопасности), буфер, достаточно кислый или щелочной для предотвращения роста бактерий, или достаточно органического вещества (например, 10 % и более ацетонитрила), чтобы затормозить их рост. Если антибактериальные добавки несовместимы с методикой, предусмотрите регулярную замены воды и очистку входного фильтра.

Не забывайте, что системы для приготовления собственной воды нужно регулярно эксплуатировать или промывать. Патроны фильтров подлежат регулярной замене, а сливные трубопроводы – периодической очистке или замене. Сроки проведения работ определяются по количеству литров очищенной воды приведенных в технических характеристиках патронов, предоставляемых изготовителем. Количество произведённой воды необходимо регистрировать, включая в это количество промывку в начале эксплуатации. Патроны подлежат замене до того, как они выработают свой ресурс.

3.1.E.4. Ацетон. Важное свойство ацетона, как уже было сказано, состоит в том, что он, как и изопропиловый спирт (ИПС), представляет собой «универсальный» растворитель. Это означает, что и ацетон, и ИПС являются полностью смешиваемыми с растворителями разных классов – парафинами, хлорсодержащими парафинами, кетонами и (что важнее всего) водой. Соответственно, с материалами основы, которые могут применяться как в нормально-фазной, так и в обращённо-фазной хроматографии, а также в случаях, когда в колонку случайно попал несмешиваемый растворитель, ацетон (или ИПС) можно использовать для «обращения фазы» или как растворяющий реагент. Например, чтобы перевести колонку на основе цианопропила из нормально-фазного режима, в котором в качестве растворителя используется смесь гексана и дихлорметана, в обращённо-фазный режим с использованием смеси ацетонитрила с водой, можно на промежуточной стадии уравновесить колонку с ацетоном или ИПС (при этом следует отметить, что на этапе обращения ни в коем случае не должны использоваться буферы; если буфер использовался ранее, до ввода в колонку ацетона или ИПС вначале уравновесьте её с растворителем без буфера).

Сколь привлекательным не казалось бы свойство универсальности, хроматографисты должны отдавать себе отчёт в том, что ацетон весьма активен химически, кроме того, подвергается самоконденсации с образованием диацетонового спирта и высших олигомеров. Обычно «состарившийся» ацетон содержит несколько миллионных долей диацетонового спирта. Как правило, в хроматографических разделениях такой уровень примеси не приводит к ошибкам. Главным их источником является применение ацето-

на в сочетании с растворителями, определяемыми веществами и подвижными фазами, с которыми он может вступать в химические реакции. Например, с течением времени ацетон вызывает необратимые химические изменения сорбента с аминопропильными группами. Следовательно, хотя ацетон и пригоден как растворитель для хроматографического анализа сахаров (где зачастую используется аминопропиловый сорбент), для длительной эксплуатации он неприемлем.

В заключение отметим, что неустойчивость или некоторые особые свойства растворителя могут оказаться опасными для пробы, растворителя или хроматографа в целом. Хроматографист должен изучить свойства растворителя, в том числе, его реакционную способность, прежде чем его применять. Это позволит избежать неточных или некорректных результатов и напрасной потери многих часов времени.

3.1.E.5. Примеси, присутствующие в растворителях высокой чистоты. Одна из главных трудностей, с которыми сталкивается производитель растворителей высокой чистоты, – это неоднородность сырья, которое используется при их производстве. Существует множество способов получения исходного сырья: фракционирование дистиллятов, получаемых в больших количествах, отбор побочных продуктов крекинга нефти, использование основных или побочных продуктов синтеза и пр. При каждом из способов состав и содержание примесей будут существенно различаться. Например, рассмотрим растворитель метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ). Если он получен из нефти, он обычно содержит многочисленные эфиры, альдегиды, кетоны и спирты. Если МТБЭ синтезирован из метанола и изобутилена, примесей в нём гораздо меньше – остатки метанола, изобутилена, спиртов из метанола и олефинов из изобутилена. Пригодность МТБЭ произведенного из разного сырья для аналитической работы определяется исключительно требованиями хроматографического разделения.

Куда важнее с точки зрения эксплуатации изменения, даже незначительные, исходного сырья с течением времени и влияние этих изменений на готовую продукцию, т.е. растворитель высокой чистоты. Примером такого рода служит метанол. Ранее метанол как сырьё содержал в большом и непостоянном количестве низкомолекулярные амины. Технология тех лет не позволяла стабильно удалять амины, поэтому чистый метанол зачастую сохранял специфический «рыбный» запах. Однако, если не принимать в расчёт неприятный запах, примеси аминов в весьма небольших количествах не приводили к ошибкам в хроматографии.

На сегодняшний день применение метанола в ВЭЖХ с примесью аминов может оказаться не столь безобидным, поскольку во многих важных

случаях хроматографист имеет дело с разделением основных азотсодержащих соединений, и даже крайне малые количества аминов в растворителе могут радикально сказаться на результатах хроматографии. Это особенно заметно сказывается в случаях, когда необходимой частью анализа является получение производных (дериватизация) соединений с функциональной аминогруппой. Соответственно, и производство исходного сырья, и завершающая обработка метанола «для ВЭЖХ» были изменены так, чтобы, при необходимости, иметь возможность удаления аминов.

Исходный ацетонитрил обычно получают как побочный продукт производства акрилонитрила. Как следствие, он часто содержит в небольших количествах образующиеся в процессе этого производства акриловую кислоту, акролеин, а также акрилонитрил. Большинство примесей успешно удаляются при производстве ацетонитрила высокой чистоты посредством химической обработки и дистилляции. Любопытное явление, присущее исключительно ацетонитрилу, – *пик на обратном градиенте*.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РС 18. **Пик «на обратном градиенте»**. Это явление имеет место при использовании сильного элюента, содержащего ацетонитрил, в конце опыта в градиентном режиме, когда систему быстро возвращают к исходным условиям (рис. 3.13). Когда состав подвижной фазы на заключительном этапе опыта изменяется, появляется пик, размер и форма которого меняются от опыта к опыту.



Рис. 3.13. Пик в конце хроматографического опыта – пик на обратном градиенте. Он имеет место, когда состав подвижной фазы начинает возвращаться к исходному. Это явление встречается почти исключительно в смесях ацетонитрила с водой.

УСТРАНЕНИЕ. Это явление не нашло объяснения, по крайне мере, такого, которые бы удовлетворило большинство хроматографистов. Достаточно сказать, что пик «на обратном градиенте» выходит гораздо позже того, как разделение анализируемых веществ окончено, а значит, представляет собой всего лишь эстетическое неудобство. С практической точки зрения лучшее отношение к этому явлению – просто его не замечать. Однако, если, например, требуется, чтобы все пики в опыте подлежали идентифи-

кации и количественному определению или истолкованию, лучше отключить функцию сбора данных, как только вышел последний пик, представляющий интерес.

Рассмотрение всех часто и редко встречающихся примесей в растворителях высокой чистоты выходит за рамки настоящего раздела. Ряд наиболее неудобных были представлены выше. Важно здесь то, что наличие загрязнителя в растворителе высокой чистоты может быть совершенно неожиданным и непредвиденным, как для пользователя, так и для изготовителя. Следует помнить, что производители не могут предугадать все варианты применения каждого растворителя, для них нецелесообразно пытаться разработать технические характеристики и методы испытаний для непредвиденных примесей в исходном сырье. Крайне важна обратная связь от пользователей к изготовителям растворителей. Такая обратная связь ставит изготовителя в известность о нарушениях в работе пользователя, которыми он впоследствии может заняться и устранить их.

3.1.E.6. Влияние растворителя на флуоресценцию. Флуориметрическое детектирование как метод часто считают предпочтительным в хроматографии, поскольку соответствующие методики анализа отличаются сочетанием как самых низких пределов обнаружения, так и самой высокой чувствительности среди распространённых методов детектирования для ЖХ. Данному методу присуща и высокая специфичность, так как число флуоресцирующих растворимых веществ невелико. Указанные свойства дают хроматографисту возможность выявить флуоресцирующие анализируемые вещества в малых концентрациях среди нефлуоресцирующих сопутствующих веществ. Если сопутствующие вещества также флуоресцируют, дальнейшее различение возможно в детекторе посредством тонкого регулирования длины волны возбуждающего излучения и точного подбора длины волны испускания для анализа.

Чтобы в полной мере использовать преимущества, которые даёт флуоресценция для анализа, разработано множество реагентов для получения флуоресцирующих производных. Эти реагенты обычно применяются для определения конкретных функциональных групп (аминов, гидроксилов или тиолов), и их специфичность создаёт дополнительные возможности выделения анализируемого вещества среди сопутствующих.

Выбор флуоресцирующего маркера зависит от типа дериватизации (пред- или постколоночной) используемой для данного анализа, поскольку прочность химической связи аналит-маркер может сильно различаться. Следовательно, в случае предколоночной дериватизации, прежде, чем разрабатывать методику анализа, важно определить время прошедшего от

получения производного до анализа, а также устойчивость продукта реакции в подвижной фазе. В случае постколоночной дериватизации следует оценить совместимость реакционного реагента с хроматографической системой, а также скорость реакции.

Если не удаётся подобрать маркер, не обладающий флуоресцентными свойствами до проведения реакции (то есть изначально не дающий отклика детектора) и флуоресцирующий после реакции, приобретает важность время выхода излишков непрореагировавшего реагента, поскольку он обычно даёт очень большой пик на хроматограммах, по сравнению с пиками определяемых веществ.

При использовании для анализа флуориметрического детектора крайне важны взаимодействия между растворителем и растворёнными веществами. Эти взаимодействия могут сильно влиять на воспроизводимость, пределы обнаружения и чувствительность методики. Прежде всего, у соединений, в электронных спектрах поглощения которых проявляются $n \rightarrow \pi^*$ - переходы (например, у кетонов) в неполярных и апротонных растворителях (например, парафинах и эфирах) флуоресценция слаба или вовсе отсутствует. Однако, в протонных растворителях (например, в метаноле) эти вещества флуоресцируют. Напротив, соединения в электронных спектрах поглощения проявляются $\pi \rightarrow \pi^*$ - переходы (например, полициклоароматические углеводороды) заметно флуоресцируют в неполярных растворителях и значительно слабее – в протонных. Наличие тяжёлых атомов в структуре молекул растворителя (например, галогенов) обычно ослабляет флуоресценцию. Это же относится к повышению температуры: повышение на каждый градус Цельсия приводит к примерно 2 %-ному ослаблению флуоресценции.

Попытки экстраполировать результаты, полученные в растворителе одной системы, на другую требуют особой осторожности, поскольку даже незначительные изменения полярности или pH растворителя часто радикально сказываются на флуоресцентных свойствах анализируемых веществ. Эти изменения обусловлены смещением длин волн максимумов возбуждения и излучения вследствие стабилизации или дестабилизации электронной структуры молекул определяемого вещества (например, за счёт протонирования или его отсутствия) или изменением полярности растворителя (например, при замене гексана на метанол).

Кроме того, сказаться на флуоресценции могут и примеси в растворителе. К примеру, акрилонитрил, акролеин и акриловая кислота и их продукты присоединения к составляющим подвижной фазы, которыми иногда бывает загрязнён ацетонитрил, при определённых условиях флуоресцируют. В особенности сильно проявляется этот эффект при использовании

трифторуксусной кислоты и при наличии примесей в ацетонитриле и метаноле. В результате на хроматограммах появляются случайные пики. Так же, как и при УФ детектировании, размер этих пиков меняется при использовании градиентного режима, поскольку он пропорционален количеству растворителя, прокачанного через колонку между градиентными анализами. Если предполагается использовать указанные сочетания растворителей, следует, перед применением, отдельно, проверить смесь растворителей на флуоресценцию.

3.1.Ж. Микрочастицы в растворителях

Наличие микрочастиц в растворителях для ЖХ может привести к множеству неисправностей. Они могут засорить фильтры на входе в резервуар, поцарапать плунжер насоса, вызвать ускоренный износ уплотнений плунжера, засорить фритты на входе в колонку. Соответственно, следует принять меры к их удалению из растворителя до его использования.

Пятнадцать лет назад растворители в лаборатории перед применением в ЖХ фильтровали практически всегда. В растворителях содержалось так много микрочастиц, что фильтр зачастую становился полностью непроницаемым или приобретал коричневый цвет после фильтрования 4-литровой бутыли (рис. 3.14). Сегодня большинство растворителей высокой чистоты фильтруют перед фасовкой. Хотя это не гарантирует полного отсутствия микрочастиц в растворителе, их количество на несколько порядков меньше, чем это было в прошлом.

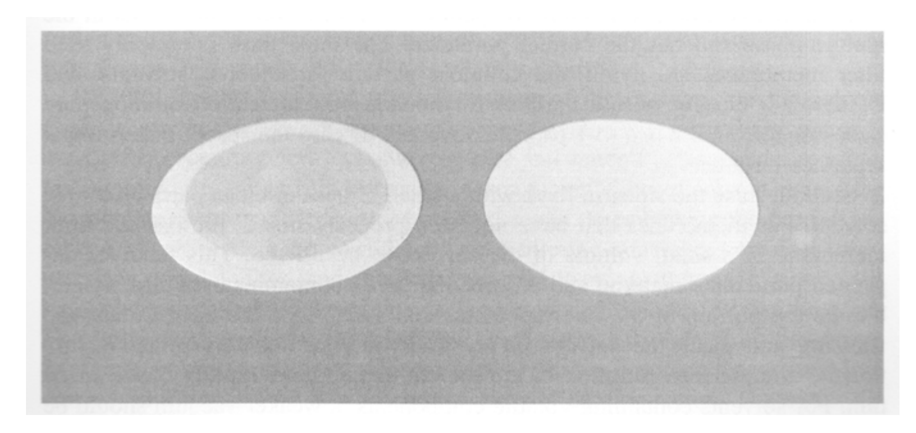


Рис. 3.14. Фильтровальная бумага: *слева* – использованная; *справа* – новая.

По меньшей мере одна фирма-изготовитель (Бердик и Джексон [Burdick & Jackson]) категорически не рекомендует фильтровать их растворители при использовании в чистом виде или в смесях без посторонних добавок. В чем причина? Причина в том, что наполнители фильтров, которые, по идее, должны удалять микрочастицы из растворителя, на самом деле добавляют в растворитель микрочастицы в количестве в 10 – 100 раз большем, чем в нём было изначально. В самом худшем случае после прохождения через фильтр в растворителе появляются не только микрочастицы, но и экстрагируемые органические вещества. Это сильно зависит от природы растворителя и фильтра, но если уж экстрагируемые вещества попадают в растворитель, они неизбежно наблюдаются на хроматограмме в виде случайных пиков-призраков. Итак, можно сэкономить время и усилия и избежать затруднений, если приобрести изначально надлежащие растворители.

Исключения из правила «не фильтровать» случаются, когда подвижная фаза содержит не только растворитель, но и модификаторы (в особенности соли). В этом случае растворитель, содержащий соли, следует готовить и фильтровать отдельно, и лишь потом смешивать с остальными компонентами подвижной фазы – растворителями высокой чистоты.

3.2. Подвижные фазы

Перед употреблением растворители зачастую подвергают предварительной обработке или модификации. На этом этапе могут выполняться любые из следующих операций: фильтрование, добавление модификаторов, приготовление буфера, отмеривание порций и смешение основных компонентов, дегазация.

3.2.А. Фильтрование растворителей

На заре жидкостной хроматографии чистота растворителей была нестабильной. Они содержали в виде примеси не только растворённые соединения, но, и даже в большей степени, микрочастицы. Поэтому перед применением растворители всегда приходилось фильтровать. Сегодня фильтровать растворители, особенно если предполагается их использование прямо из заводской тары, не рекомендуется, поскольку фильтровальные аппараты, скорее, добавляют микрочастиц в растворитель, чем удаляют их.

При фильтровании растворителя необходимо убедиться в том, что материал фильтра совместим со всеми компонентами растворителя. Кроме того, удостоверьтесь, что размер пор материала фильтра меньше, чем входного фильтра, проходного фильтра, установленного в трубопроводе хромато-

графа, и фритты на входе в колонку. Фильтровальный аппарат показан на рис. 3.15. В его состав входят: колба Бунзена с боковым патрубком, с

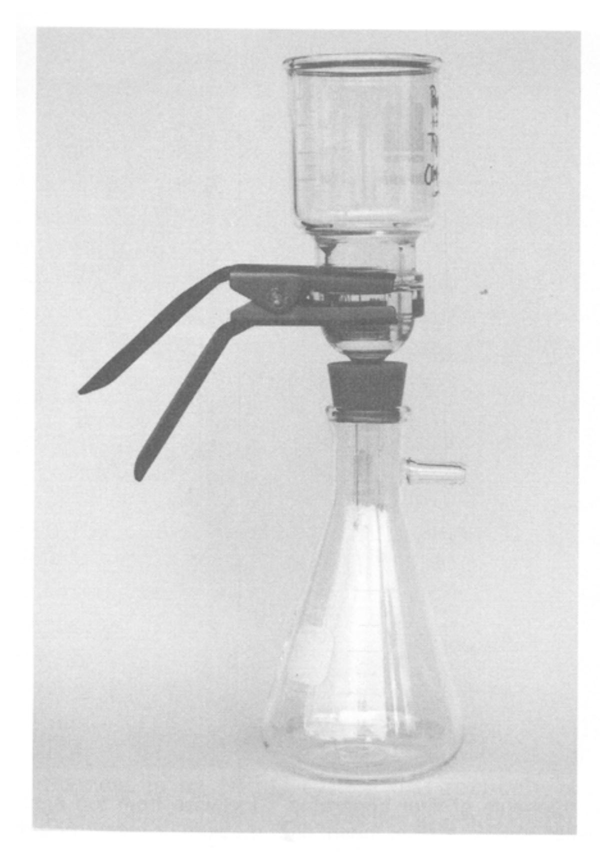


Рис. 3.15. Аппарат с колбой, боковым патрубком и резервуаром для фильтрации для элюента в сборе.

помощью которого создаётся разрежение, и верхней горловиной, куда вставляется основанием фильтровальный узел. Как показано на рис. 3.16, фильтровальный узел состоит из следующих пяти частей: (1) стеклянное основание, соответствующее по диаметру горловине колбы Бунзена; (2) опора фильтра (представляет собой либо съёмную сетку из нержавеющей стали, либо деталь из отожжённого стекла в неразъёмном соединении с основанием); (3) мембрана фильтра; (4) стеклянный резервуар, соответствующий

по диаметру верхней части основания и фиксирующий мембрану фильтра; (5) зажим, удерживающий вместе основание и резервуар.

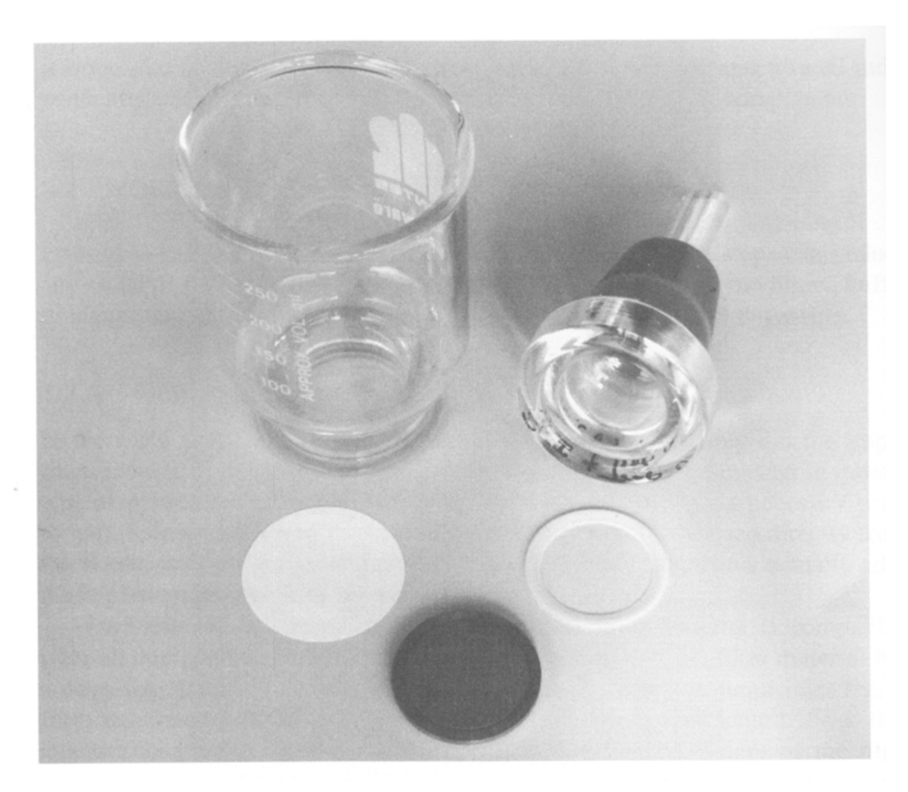


Рис. 3.16. Детали аппарата для фильтрования растворителей. По часовой стрелке, начиная с правого верхнего угла: резервуар, держатель фильтра, вкладыш из ПТФЭ, сетка из нержавеющей стали, материал для фильтровальный или диск-мембрана.

Надлежащее фильтрование растворителя состоит из следующих этапов. Во-первых, необходимо убедиться в том, что мембрана фильтра химически совместима со всеми компонентами подвижной фазы и имеет подходящий размер пор. Чаще всего в этом качестве используются три материала: для растворителей на водной основе – нейлон и ацетатная целлюлоза, для безводных растворителей – фторопласт (или материал имеющий аналогичные свойства). Размер пор обычно от 0,2 до 1 мкм. Прокладки, которыми разделяются фильтры в упаковке, следует удалить и утилизировать.

Во-вторых, необходимо промыть колбу с боковым патрубком небольшим количеством чистого растворителя, не содержащего микрочастиц. Если есть подозрение, что мембраны хранились в ненадлежащих условиях, следует смочить мембрану, которую предполагается использовать, в небольшом количестве растворителя, подлежащего фильтрованию. Это позволяет удалить микрочастицы, осевшие на мембране, и адсорбированные из воздуха загрязнители. В-третьих, необходимо собрать верхнюю часть фильтровального аппарата и вставить её в колбу Бунзена. Далее следует подключить источник разрежения, и залить в резервуар растворитель. Если растворители не содержат летучих компонентов, фильтрование может проходить быстро – около 4 л за 15 мин. Если растворители содержат летучие компоненты, разрежение должно быть слабее, чтобы минимизировать потерю указанных компонентов.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РП 1. **Непредвиденные пики в градиентном опыте**. После приготовления и фильтрования растворителей провели холостой опыт в градиентном режиме, чтобы проверить стабильность нулевой линии. Результаты показаны на рис. 3.17.

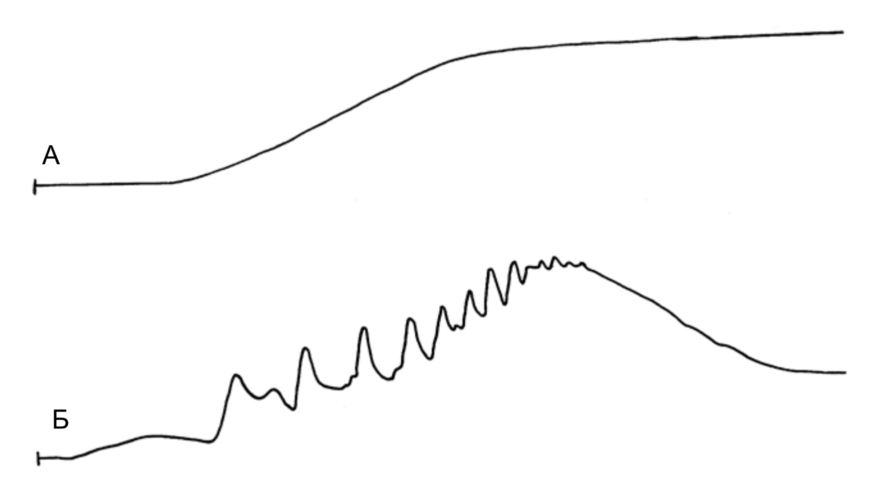


Рис. 3.17. Хроматограмма градиентного опыта смеси воды с ацетонитрилом: от соотношения 50:50 (по объёму) до 100 % ацетонитрила с использованием колонки C_{18} (254 нм): (А) использованы чистые растворители; (Б) растворитель загрязнён материалом фильтра.

УСТРАНЕНИЕ. Вначале наиболее очевидным источником проблем представлялись наличие примесей в растворителе. В этом случае использовалась простейшая смесь ацетонитрила с водой. После приобретения новых

партий ацетонитрила и воды и последующего фильтрования был проделан новый опыт, который, однако, дал тот же результат. Вероятность того, что две отдельные партии растворителя дают одинаковые профили примесей в градиентном режиме на хроматограмме, весьма мала. Чтобы выяснить источник ошибки, необходимо принять в расчёт следующие возможности: загрязнённый резервуар фильтровального аппарата, загрязнённый резервуар или входной фильтр хроматографа, а также сам материал фильтра. В данном случае, поскольку соли в растворитель не добавляли, было рекомендовано не фильтровать растворитель. Ошибка исчезла, как только растворители начали заливать в резервуар хроматографа непосредственно из тары изготовителя. Помните: *всё*, что соприкасается с растворителем, является потенциальным источником загрязнения. Следовательно, количество этапов его обработки должно быть как можно меньше.

Правило «не фильтровать» распространилось настолько широко, что сейчас изготовители предлагают растворители в контейнерах, облицованных фторопластом, откуда их можно заливать непосредственно в хроматограф для ВЭЖХ. Типичный резервуар в настоящее время имеет ёмкость 10 или 20 л. Чтобы ещё более снизить вероятность загрязнения, такие контейнеры могут предназначаться исключительно для одного растворителя и для одного пользователя.

На сегодняшний день единственный случай, когда фильтрование попрежнему рекомендуется, – это когда к растворителю добавляют твёрдые модификаторы подвижной фазы. Сюда относятся соли, например, фосфат калия или ацетат натрия, и твёрдые органические вещества, например, этилендиаминтетрауксусная кислота или циклодекстрин. В подобных случаях содержание микрочастиц в твердых солях достаточно велико, чтобы оправдывать целесообразность фильтрования перед применением.

3.2.Б. Приготовление подвижной фазы

В настоящее время является общепризнанным, что воспроизводимость в хроматографии зависит от надёжности и постоянства работы оборудования. В конце концов, на оборудование, обладающее этими свойствами, расходуются десятки тысяч долларов. Колонки стоят сотни долларов, и с ними обращаются со всей возможной осторожностью. Обычно их не держат на складе в большом количестве. Пробы зачастую являются уникальными, и поэтому также заслуживают особого внимания. С другой стороны, подвижную фазу готовят из недорогих ингредиентов, которые поступают из источника, кажущегося неисчерпаемым, – с полок в шкафу для химреактивов. Их

смешение для приготовления подвижной фазы представляется банальным и не столь уж важным. Банально? Возможно. Неважно? ОТНЮДЬ НЕТ!

Единственный элемент хроматографа для ВЭЖХ, который систематически изменяется от анализа к анализу, – это подвижная фаза. Следовательно, чтобы хроматограммы были воспроизводимы, окончательный состав подвижной фазы должен быть одним и тем же раз за разом. Чтобы этого добиться, должны быть выполнены два условия. Во-первых, инструкция по приготовлению должна быть точной и недвусмысленной. Во-вторых, лицо, готовящее подвижную фазу, должно её неукоснительно исполнять. Примеры надлежащего описания и приготовления приведены ниже.

Простейшим вариантом методики приготовления подвижной фазы является смешение двух или более однокомпонентных растворителей. Если, к примеру, готовится 1 л смеси метанола с водой в соотношении объёмных долей 50:50, следует отмерить по отдельности по 500 мл каждого компонента, а затем перенести их в резервуар хроматографа (или другой подходящий резервуар). Затем смесь тщательно перемешать. Полученный объём смеси несколько меньше 1 л, зато соотношение объёмных долей метанола и воды в точности 50:50.

Готовить элюенты следует всегда достаточно задолго до работы. Дело в том, что при смешении температура может довольно сильно измениться. Изменение температуры, в свою очередь, существенно скажется на времени хроматографического удерживания. Например, смешение метанола с водой – экзотермический процесс. Смесь становится тёплой на ощупь. Напротив, смешение ацетонитрила с водой – процесс эндотермический, смесь становится на ощупь холодной. В зависимости от того, какой объём элюента готовится, уравновешивание до комнатной температуры может занять несколько часов. Наилучший подход – готовить смесь накануне использования.

Следующий простейший вариант приготовления растворителя – добавление жидкого модификатора подвижной фазы к растворителю. Чтобы объём модификатора, добавляемый в растворитель, был воспроизводимым, необходимо всегда следовать конкретной методике приготовления. Наиболее воспроизводимые результаты получают, когда модификатор добавляют в подвижную фазу после того, как пройдены все остальные этапы приготовления. Например, необходимо добавить 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФК) в смесь ацетонитрила с водой в соотношении объёмных долей 50:50. Вначале следует смешать 500 мл ацетонитрила и 500 мл воды, затем перенести с помощью пипетки аликвотное количество 1 мл ТФК в смесь и тщательно перемешать. Хотя, строго говоря, это не 0,1 % (это

1/1001 или 0,0999 %), погрешность минимальна и хроматографических последствий не имеет. Необходимо помнить также, чтоб общий объём полученной таким образом смеси ацетонитрила с водой всё равно не точно составляет 1000 мл. Важно здесь то, что при следовании методике приготовления в растворитель всякий раз добавляют одно и то же количество ТФК. Вот почему так важно всегда соблюдать последовательность операций в методике.

Самый сложный вариант приготовления подвижной фазы связан с использованием буферных растворов. Ключевым фактором правильного приготовления элюента является правильное приготовление буфера. К сожалению, во многих задокументированных методиках описание приготовления получаемого элюента зачастую неясно. Например, описание «смесь метанола с водой в соотношении объёмных долей 60:40 с 20 мМ фосфатным буфером с pH=2» непонятно, потому что pH плохо определяется в смесях органических веществ с водой. Не указан также противоион фосфата. Это значит, что либо это не важно, либо просто забыли указать. Кроме того, при таком описании состав подвижной фазы может быть любым из следующих: (**1**) вначале смешали 600 мл метанола и 400 мл воды, затем добавили 20 мМ фосфата, и довели pH до 2 (что бы это ни значило в смеси органического вещества с водой); (**2**) к 600 мл метанола добавляли 400 мл 20 мМ водного фосфатного буфера с pH=2, либо (**3**) смешивали 600 мл метанола и 400 мл 50 мМ водного фосфатного буфера с pH=2, так что концентрация фосфата в готовом растворителе составляла 20 мМ. Следует обратить внимание на то, что в вариантах (**2**) и (**3**) не содержится никаких указаний на значение pH *готовой* смеси, однако известно точное значение pH водного раствора, добавляемого к метанолу, так что смесь растворителей будет всегда воспроизводимой. Необходимо заметить также, что окончательная концентрация буфера в варианте (**2**) составляет 8 мМ, а в (**3**) – 20 мМ. Эта разница существенна, но в приведенном описании невозможно понять, о чём идёт речь. Итак, подробное и точное описание приготовления растворителя чрезвычайно важно для обеспечения воспроизводимости в хроматографии.

Так же подробно должно быть описано приготовление буфера. В данном случае приемлемая методика приготовления могла бы выглядеть так: «к одному литру воды класса «чистая для ВЭЖХ» добавляли 2,35 г KH_2PO_4, доводили значение pH до 2, добавляли H_3PO_4 (1,6 мл концентрированной H_3PO_4).» Если точность соблюдения pH в готовом растворе не важна, указание на добавление 1,6 мл H_3PO_4 может оказаться достаточно точным. Если значение pH важно, тогда для контроля pH раствора используют электрод для измерения pH и «осторожно приливали H_3PO_4, пока не достигается в

точности pH = 2». В вышеприведенном примере точность pH не столь уж важна, однако его значение должно быть около 2, т.е. результирующее значение pH указывают, как 2, а не 2,0 и не 2,00.

Далее приведём недвусмысленное описание приготовления подвижной фазы: «смесь метанола с водой (50 мМ фосфатный буфер, pH = 2) в соотношении объёмных долей 60:40. В этом случае нет никаких сомнений в том, что буфер – часть водной фазы, и что соотношение метанол:буфер 60:40 соответствует окончательному составу рабочей подвижной фазы.

В случае добавления солей (в последнем примере KH_2PO_4) к растворителю, обязательно следует выдержать готовый элюент столько, сколько нужно, чтобы его температура уравнялась с комнатной. По мере остывания раствора, из него начинают выпадать в осадок соли (вспомните, что получение пересыщенного раствора путём нагревания – классический способ рекристаллизации твёрдых веществ). Следовательно, если использовать раствор в качестве подвижной фазы немедленно по приготовлении, осаждение солей будет иметь место внутри хроматографа. Эмпирическое правило состоит в том, чтобы готовить растворители, содержащие соли, накануне использования, а перед работой тщательно проверять на наличие осадка или разделение фаз. Эта мера предосторожности убережёт от серьёзных неприятностей.

При смешивании двух и более основных компонентов раствора то, как в точности их смешивают, ничуть не менее важно, чем приготовление буфера. Прежде всего, следует точно указывать, о каких долях идёт речь. Чаще всего указывают соотношение объёмных долей (в англоязычной литературе обозначается v/v). Однако иногда используют отношение массовой доли к объёмной (w/v) и соотношение массовых долей (w/w). Массу измеряют чаще всего тогда, когда нужно с высокой точностью выдержать количество добавляемого вещества. Это в особенности справедливо для растворителей для нормально-фазной хроматографии, где количество полярного ингредиента может быть менее 1 %, так что отклонение на ± 0,01 % и даже менее может быть существенным.

Если указано соотношение объёмных долей, приготовить смесь ацетонитрила с водой в соотношении 50:50 можно тремя способами: (**1**) перенести 500 мл ацетонитрила в мерный стакан ёмкостью 1 л, довести до требуемого объёма водой, тщательно перемешать; (**2**) перенести 500 мл воды в мерный стакан ёмкостью 1 л, довести до объёма ацетонитрилом, тщательно перемешать; (**3**) отмерить 500 мл ацетонитрила и 500 мл воды в отдельных сосудах, перенести обе жидкости в один сосуд, затем тщательно перемешать. Если точно придерживаться этих указаний, будут получены

три разных состава подвижной фазы. Единственный процесс, позволяющий воспроизводимо получить смесь ацетонитрила с водой в соотношении объёмных долей 50:50, – это (**3**). Ещё раз заметим, чтоб разработка и неукоснительное соблюдение методики приготовления растворителей крайне важны для получения воспроизводимых результатов хроматографии.

Фильтровать элюент лучше всего после добавления твёрдых составляющих в растворитель, но до смешивания основных компонентов элюента. При таком порядке приготовления происходит меньше потери летучих компонентов раствора. Чаще всего это касается только водной части элюента.

Итак, воспроизводимое приготовление элюентов зависит от наличия недвусмысленных инструкций по их приготовлению. Наибольшее совпадение результатов разделения от партии к партии растворителей достигается, если отдельно готовят водный буфер (в случае, когда он используется), далее его фильтруют (когда это необходимо), дегазируют все составляющие по отдельности, отмеряют соответствующий объём (или массу) каждого из компонентов, затем смешивают растворители окончательно. На каждом этапе необходимо тщательно перемешивать все растворы и элюенты.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РП 2. **Приготовление свежего элюента приводит к изменению времён удерживания или образованию сдвоенных пиков**. Неправильное приготовление буфера для элюента приводит либо к тому, что концентрация слишком мала, чтобы pH не изменялся после ввода пробы, либо к тому, что значение pH вообще не соответствует необходимому. Это особенно серьёзно сказывается на результатах разделения, если анализу подлежат карбоновые кислоты.

УСТРАНЕНИЕ. На рис. 3.18 А показан результат влияния неправильного приготовления буфера. Проба аскорбиновой кислоты была введена в систему с буфером, pH которой близок к pK_a кислоты. «Размазанный» сдвоенный пик на хроматограмме является результатом равновесия протонированных и депротонированных (несущих заряд) молекул кислоты. Когда значение pH раствора находится ниже pK_a, молекулы кислоты полностью протонированы, в результате на хроматограмме получается одиночный симметричный пик с приемлемым временем удерживания (рис. 3.18 Б). Заметим, что для разделения кислот, буферы с pH, превышающим их pK_a, обычно не используют. Если их применять, как анализируемое вещество, так и поверхность силикагеля будут нести отрицательные заряды, так что элюирование кислоты может произойти даже *ранее* времени выхода неудерживаемого компонента. Дело в том, что отрицательный заряд поверхности препятствует проникновению отрицательно заряженного анализируемого вещества в поры.

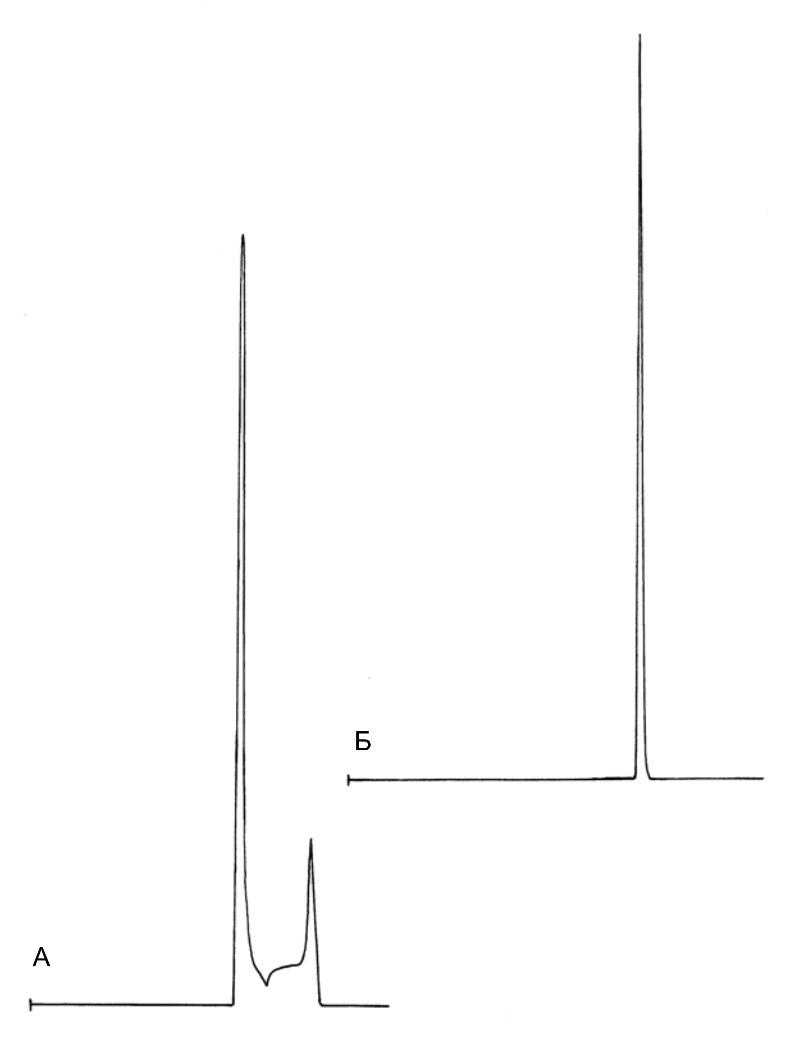


Рис. 3.18. (А) Хроматограмма аскорбиновой кислоты, записанная при значении pH элюента ~ pK_a кислоты. (Б) Хроматограмма аскорбиновой кислоты, полученная при значении pH << pK_a кислоты.

Неправильное применение буфера в элюентах приводит к ухудшению формы пиков основных аминов не в меньшей степени, чем карбоновых кислот. В случае основных аминов, зачастую срез пика сильно удлиняется. Образование «хвоста» обусловлено сильными силанофильными взаимодействиями между остаточными силанольными группами поверхности и функциональной группой аминов. Это явление обсуждается в разделе 3.9.А.

Итак, важно надлежащим образом задать как концентрацию, так и pH растворителей, используемых для разделения. Правильная методика приготовления элюентов должна быть недвусмысленно описана и неукоснительно соблюдаться.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РП 3. **Меняются времена выхода веществ и форма нулевой линии**. Небольших изменений времён выхода определяемых веществ с течением времени вполне можно ожидать. Валидированные методики обычно разработаны так, чтобы принимать в расчёт такие нормальные изменения. Однако более значительные изменения времён удерживания – повод для беспокойства. Такие изменения могут иметь место либо между сериями анализов однотипных проб, либо внутри серии.

УСТРАНЕНИЕ. В валидированных методиках наиболее подвержены изменениям следующие три параметра ВЭЖХ: температура (поскольку обычно анализ проводят при комнатной температуре), состав подвижной фазы и тип колонки.

Рассматривая возможности избежать ошибок, часто забывают о температуре, хотя она может стать их причиной. Даже в лаборатории с регулируемой температурой в течение суток температура может изменяться на ± 3 °C и более, поскольку зачастую задаются различные температурные режимы в помещении для дня и ночи, а температуру контролируют только в термостате. Воздуховоды системы отопления обычно проходят по периметру помещения, а системы охлаждения – по центру потолка. Как правило, влияние изменений температуры проявляется непосредственно как колебания нулевой линии, следующие за циклом нагревания и охлаждения [*]. Это особенно заметно сказывается при использовании рефрактометров и УФ детекторов при работе в режиме с высокой чувствительностью.

Следовательно, важным является взаимное расположение выходов воздуховодов систем отопления/охлаждения и термостата. Чем ближе блок хроматографа с любому из выходов, тем сильнее проявляется это влияние. Если хроматограф нельзя переставить так, чтобы он не стоял рядом с

---

[*] *В зависимости от времени суток (прим. редактора).*

выходом воздуховода (или под ним), следует заэкранировать хроматограф так, чтобы выходящий из воздуховода воздух, температура которого резко отличается от температуры в помещении, отклонялся от хроматографа. Это позволит свести к минимуму влияние изменений температуры на воспроизводимость результатов.

Подвижная фаза нуждается в частом пополнении. Чтобы результаты были наиболее воспроизводимыми, следует приготовить подвижную фазу в количестве, достаточном для серии анализов. В противном случае, если при приготовлении подвижной фазы будет допущена серьёзная ошибка, это не замедлит сказаться. Резко изменятся времена удерживания, что заставит готовить подвижную фазу заново. Чтобы избежать изменений в составе элюентов, необходимо разработать набор типовых методик их приготовления. Затем, чтобы получать воспроизводимые результаты, следует придерживаться этих методик. Часто забывают о том, что последний этап приготовления подвижной фазы должен быть таким, после которого её состав будет однородным. Для этого подвижную фазу необходимо перед применением тщательно перемешать.

Не столь очевидны медленные изменения состава подвижной фазы. Главными источниками таких изменений являются длительное хранение и постоянное барботирование. Многие растворители (например, смесей метанола с водой и ацетонитрила с водой) вполне допускают длительное хранение. Ошибки возникают, когда используют в большой концентрации солевые буферы или в малой концентрации – летучие компоненты. В этих случаях, если элюент хранился более двух недель, не стоит использовать его, а приготовить свежий.

Ряд производителей приборов для ВЭЖХ предлагают постоянно барботировать подвижную фазу, чтобы избежать ошибок, обусловленных плохой дегазацией растворителей. К сожалению, при барботировании зачастую избирательно выводятся наиболее летучие, как правило, органические, компоненты. В следующем разделе, посвящённом дегазации, этот вопрос рассмотрен подробнее.

3.2.В. Дегазация растворителя

Дегазация растворителя – также весьма важный этап приготовления элюентов. Дегазация преследует две цели. Во-первых, снижается количество газа, растворённого в растворителе. Благодаря этому, снижается вероятность попадания пузырьков газа в кювету детектора и «застревания» там. В подобных случаях на выходе детектора сигнал приобретает пилообразную

форму (с циклом, обратным по отношению к циклу работы насоса) и работать становится невозможно.

Во-вторых, дегазация устраняет вредное воздействие воздуха, содержащегося в растворителе. Азот, основная составляющая воздуха, такого воздействия не оказывает. N_2 не поглощает в УФ диапазоне и не является химически активным при обычных условиях хроматографии. Однако кислород, вторая основная составляющая воздуха, приводит к возникновению значительных проблем. Кислород не только химически активен, но и имеет значительное поглощение в ближнем УФ диапазоне. Он также активен электрохимически и значительно снижает рабочие возможности детектора или приводит к его выходу из строя.

Чтобы проиллюстрировать, к каким ошибкам может привести O_2 при УФ детектировании, Браун и др. [10] барботировали метанол гелием и записывали нулевую линию по коэффициенту поглощения в широком диапазоне длин волн. Затем метанол насыщали воздухом. Вследствие этого коэффициент поглощения возрос на 0,02 на длине волны 260 нм, на 0,05 при 240 нм, на 0,22 при 220 нм и на 0,38 – при 210 нм. Измеренный таким образом коэффициент поглощения на 210 нм оказался чуть ли не вдвое больше, чем коэффициент поглощения чистого метанола.

Универсальных способов дегазации растворителей не существует. Во многих современных хроматографах для ВЭЖХ устройство дегазации (или барботирования) встроено. Каналы барботирования могут быть вмонтированы непосредственно в резервуар, а блок дегазации может быть размещён между резервуаром и головкой насоса.

Если хроматограф для ВЭЖХ не содержит устройств дегазации и барботирования, дегазация растворителя должна предшествовать применению. К распространённым методам дегазации вручную относятся ультразвуковая обработка, вакуумирование, одновременные ультразвуковая обработка и вакуумирование, барботирование гелием или аргоном и нагревание.

Среди способов дегазации растворителей чаще всего используются ультразвуковая обработка и вакуумирование, поскольку соответствующие технические средства обычно имеются в любой лаборатории. При правильном применении (например, при достаточной длительности обработки 10 – 15 мин) оба способа равно эффективны. Барботирование также эффективно, однако его распространению препятствуют соображения доступности и стоимости газа в баллонах, а также безопасности при работе с сосудами под давлением. Нагревание, хотя и является эффективным способом, создаёт производственные опасности и увеличивает продолжительность приготов-

ления элюента, поскольку полученная смесь должна остыть до комнатной температуры (в инертной атмосфере) перед использованием.

Чтобы получить наилучшие результаты анализов, целесообразно дегазировать все растворители перед употреблением. Независимо от того, какой способ для этого применяется, необходимо заботиться о том, чтобы уменьшить продолжительность дегазации растворителя, чтобы не успел измениться его состав. По окончании дегазации в верхнюю часть резервуара можно под небольшим давлением подавать газ, которым выполнялось барботирование (обычно гелий или аргон), чтобы предотвратить контакт воздуха с элюентом.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ РП 4. **Времена удерживания пиков изменяются в серии анализов в течение дня**. Для анализируемых веществ, молекулы которых не склонны образовывать водородные связи, форма пиков остаётся относительно неизменной, но времена удерживания ($t_г$) изменяются. Если вещества способны образовывать сильные водородные связи (как, например, первичные амины), $t_г$ смещается, удлиняются срезы пиков. Это явление иллюстрирует рис. 3.19.

УСТРАНЕНИЕ. Времена удерживания изменяются, поскольку в процессе дегазации из растворителя уносятся главным образом наиболее летучие компоненты. Если ни один компонент не содержится в растворителе в количестве менее 10 %, это не приводит или почти не приводит к ошибкам. Однако, если содержание тех или иных компонентов меньше, особенно летучих модификаторов подвижной фазы, их потеря при дегазации может сказаться очень сильно на разделении.

Например, триэтиламин и трифторуксусную кислоту (ТФК) добавляют в подвижную фазу в малых количествах (часто 0,2 % и менее), чтобы воспрепятствовать реакциям анализируемых веществ с силанольными группами поверхности (напомним, что наличие силанольных групп на поверхности сорбентов – главная причина асимметрии пиков первичных аминов). Если элюент постоянно барботировать, триэтиламин и ТФК быстро из него удаляются. Однако даже небольшие потери означают резкое изменение их содержания в элюенте, что существенно влияет на результаты хроматографии.

Лучшее, что можно сделать, чтобы не допустить изменения состава растворителя из-за дегазации, – провести первичную дегазацию. В хроматографах, где имеется специальная трубка-барботёр, по окончании первичной дегазации, следует извлечь барботёр из элюента и расположить его над уровнем дегазированного раствора, не извлекая, однако, полностью из резервуара. Если в установке барботёр не предусмотрен, расположите

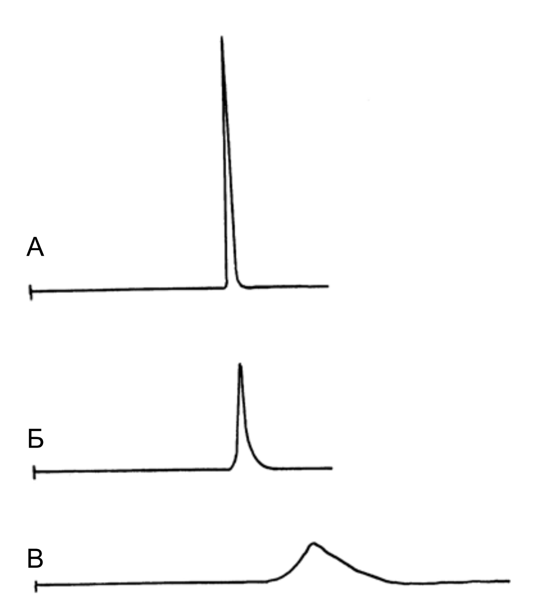


Рис. 3.19. (А) Хроматограмма, полученная с применением свежеприготовленной подвижной фазы, на которой присутствует пик анализируемого вещества. Результаты получены с использованием стандартного раствора амина. Подвижная фаза – смесь метанол-вода-ТФК в соотношении объёмных долей 50:50:0,1. Подвижная фаза подвергается постоянному интенсивному барботированию гелием. (Б) Хроматограмма того же стандартного раствора. Проба введена спустя 3 часа барботирования. (В) Хроматограмма того же стандартного раствора. Проба введена после барботирования в течение целого дня.

трубку подкачки газа в резервуаре над уровнем элюента. Установите слабую подачу газа для барботирования, так, чтобы создать в надповерхностном объёме резервуара небольшое избыточное давление. В этом случае слой инертного газа препятствует проникновению воздуха в элюент *. Если не используются ни барботёр, ни подкачка газа, элюент следует дегазировать и закрыть крышкой с вентилем, чтобы максимально ограничить доступ воздуха к растворителю. Если и это невозможно, необходимо предусмотреть достаточно частое пополнение элюента свежедегазированной порцией.

Обеспечить сохранение элюента в дегазированном состоянии, но так, чтобы при этом не допустить изменения его состава, гораздо труднее. Для этой цели используют двойной резервуар. Элюент, разделенный на две порции, имеющие одинаковый состав, помещается в два соединённых последовательно резервуара. Резервуар А закрыт герметически, однако в

* *Это справедливо для газов тяжелее воздуха, например, аргона (прим. редактора).*

нём имеются входной патрубок для барботирования и выходной патрубок. Выходной патрубок расположен *над* поверхностью растворителя в резервуаре А. В этом случае из резервуара А в резервуар Б поступает только газ. Выходной патрубок входит в растворитель в резервуаре Б, где доведённый до равновесного состояния насыщенный растворителем газ проходит сквозь растворитель (это, по идее, то же, что использование предколонки, которой жертвуют, чтобы уравновесить подвижную фазу и защитить следующую по потоку колонку, т.е. аналитическую). В такой установке можно добиться долговременной стабильности состава растворителя. Это особенно эффективно, если предполагается, что анализ пробы займёт много времени. В этом случае ёмкость резервуара Б может быть 4 л или более, а резервуара А – 1 л. В случае весьма чувствительных разделений резервуар А, возможно, придётся периодически заменять.

3.3. Резервуары

Зачастую резервуар воспринимают просто как вместилище для элюента. Отчасти это справедливо. Однако резервуар, кроме того, что в нём содержится элюент, выполняет три защитные функции. Во-первых, резервуары по большей части изготовлены из стекла – материала прочного и химически инертного. Во-вторых, в отличие от фторопласта, также химически инертного и не проявляющего реакционной активности, однако проницаемого для кислорода, стекло не пропускает в растворитель воздух и содержащиеся в нём загрязнители. В-третьих, если используется стекло янтарного цвета, оно поглощает значительную часть УФ излучения, ослабляя его воздействие на элюент. Это важно, поскольку УФ излучение может инициировать и ускорить разложение (например, олефинов, эфиров и хлорсодержащих растворителей). Итак, резервуар не только вмещает элюент, но и поддерживает его в неизменном виде.

В качестве резервуаров могут использоваться стеклянные бутыли, в которых растворители поставляется от изготовителя. Такие бутыли в ряде случаев поставляются с защитным пластмассовым покрытием. Это покрытие действительно предохраняет бутыль от механических повреждений, однако может быть источником загрязнения, поскольку некоторые растворители его растворяют или экстрагируют из него остатки пластификатора.

Как и любую химическую стеклянную посуду, резервуары перед повторным использованием необходимо надлежащим образом очистить и высушить, чтобы удалить все, даже следовые, количества органических веществ и других загрязнителей. Хранить резервуары нужно в закрытом

или упакованном виде, чтобы не допустить осаждения органических веществ и микрочастиц из воздуха на внутренней поверхности.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ Р 1. **Загрязнённый резервуар: иногда возникает необходимость использовать резервуары попеременно для разных растворителей**. При недостаточной очистке в резервуаре могут остаться следы предыдущего элюента, что приведёт к нарушению воспроизводимости времён удерживания и появлению случайных пиков. Если в качестве модификаторов используются соли, нарушения работы могут быть ещё более значительными.

УСТРАНЕНИЕ. В зависимости от специфики применения, имеются пять различных подходов. По возможности, рекомендуем использовать первый из них.

1. По возможности, следует использовать растворитель в качестве элюента прямо из тары изготовителя. Это позволяет эффективно предупредить случайное попадание растворимых загрязнителей и микрочастиц. Естественно, при этом следует использовать растворители класса чистоты «для ВЭЖХ, не содержащий микрочастиц».
2. Если в резервуаре хроматографа необходимо сменить элюент на другой смешиваемый с ним, остатки предыдущего следует слить, ополоснуть резервуар 3 – 5 порциями элюента, имеющего новый состав, и только затем заполнить свежим новым элюентом.
3. Если в резервуар хроматографа необходимо залить новый элюент, который не смешивается с предыдущим (и при этом ни в одном из них не содержится буфер), следует промыть резервуар промежуточным растворителем, смешиваемым с обоими основными. Обычно такие растворители называют «универсальными». Наиболее распространёнными из них являются изопропиловый спирт (ИПС) и ацетон. Выбор одного из двух определяется чаще всего предпочтениями: ИПС имеет малую границу пропускания в УФ диапазоне, но медленно испаряется; ацетон имеет высокую границу пропускания в УФ диапазоне, но испаряется быстро. Следующая возможность – использовать ТГФ, но он гораздо дороже и создаёт сложности при хранении из-за образования перекисей. Ещё раз заметим, что необходимо промывать резервуар достаточное число раз небольшими отдельными порциями, чтобы полностью вымыть первую подвижную фазу. Затем следует полностью удалить промежуточный растворитель прежде, чем заливать в резервуар новый растворитель или элюент. Такой прием также эффективно применяется для «обраще-

ния» хроматографа для ВЭЖХ при переходе с одного элюента на другой, не смешиваемый с первым.

Если в составе элюента имеется буфер, особенно приготовленный из твердых солей, вначале следует промыть резервуар этим же элюентом но без буфера. Таким образом, исключается возможность высаливания в резервуаре при последующих промывках. После удаления буфера последующее промывание необходимо выполнять, как описано выше (соответствующими способами для смешиваемых и несмешиваемых элюентов).

4. Если в составе элюента содержатся модификаторы подвижной фазы, в особенности соли – фосфаты, бораты, ацетаты – важно полностью удалить из резервуара всё остаточное количество жидкости перед следующим употреблением. Слить остатки элюента, затем тщательно промыть резервуар небольшими количествами попеременно ацетона и воды. Этот цикл должен оканчиваться на ацетоне. Аналогично, если резервуар вначале был промыт мылом или моющим средством, следует удалить их остатки, промывая большим объёмом воды. Чтобы ускорить высушивание, можно промыть резервуар небольшим количеством ацетона. Затем, перед новым применением, высушить резервуар в перевёрнутом состоянии.
5. Если немедленное повторное применение резервуара не предполагается, и при этом элюент не содержал ни буферов, ни модификаторов на основе солей, необходимо его перевернуть (чтобы внутрь не попадали микрочастицы из воздуха) и дать остаткам элюента стечь. Затем оставить резервуар высыхать на воздухе в перевёрнутом положении. Чтобы резервуар оставался чистым и в него не попадали микрочастицы, следует закрыть его колпачком с покрытием из фторопласта или обернуть горловину алюминиевой фольгой. Чтобы подготовить резервуар к работе, необходимо ополоснуть одной-двумя порциями нового элюента.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ Р2. **Длительное хранение растворителей**. Многие растворители для ВЭЖХ считаются устойчивыми. Некоторые действительно таковы. Часто, если растворитель очищен и помещён под слой инертного газа в герметически закрывающуюся бутыль из стекла янтарного цвета, он действительно не меняет своих свойств очень долго. К распространённым растворителям для ЖХ, остающимся качественными (химически устойчивыми) в течение года и более при надлежащих условиях хранения, относятся парафины (например, гексан, гептан), толуол, ксилолы, ацетонитрил, спирты (например, метанол, ИПС) и этилацетат.

К сожалению, отсюда следует, что многие часто применяемые другие растворители неустойчивы. К таковым относятся эфиры (например, этиловый эфир, тетрагидрофуран), хлорсодержащие растворители (например, дихлорметан, хлороформ, четырёххлористый углерод), ацетон и вода. Эфиры образуют перекиси, которые обладают весьма высокой реакционной способностью по отношению к широкому спектру других соединений. Рис. 3.20 иллюстрирует результаты реакции определяемого вещества с перекисями, образовавшимися в ТГФ. К тому же, перекиси, накапливаясь, становятся источником повышенной опасности.

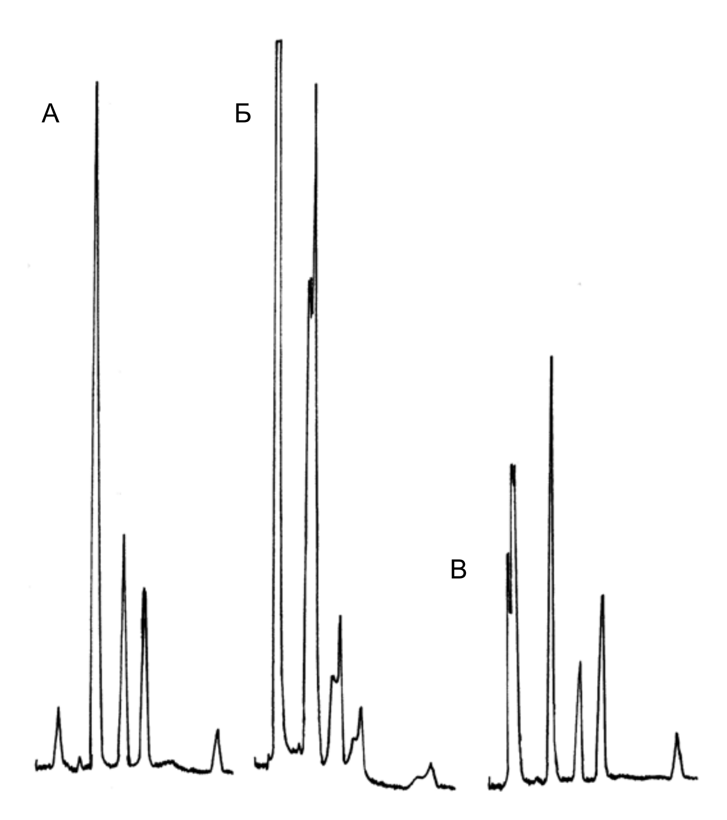


Рис. 3.20. Хроматограммы смеси веществ, чувствительных к воздействию перекисей. (А) Проба приготовлена в изопропиловом спирте (ИПС); расщепления пиков нет. (Б) Аналогичная проба приготовлена в ТГФ с высоким содержанием перекисей; пики расщеплены. (В) Проба приготовлена в подвижной фазе: смесь ИПС-декалин®-ТГФ, соотношение объёмных долей 80:15:15; расщепления пиков нет. Следует отметить, что в этом случае разбавленный ТГФ оказывается вполне пригодным.

Разлагаются с течением времени и хлорсодержащие растворители, образуя химически активные побочные продукты со свободными радикалами и HCl; впрочем, в хроматографии это проявляется не столь заметно. Накопление HCl приводит к изменению pH подвижной фазы, что сильно затрудняет работу в нормально-фазном варианте. Ацетон подвергается алдольной концентрации с образованием диацетонового спирта, при этом кислоты и основания служат катализаторами. Хотя эти процессы, как правило, не приводят к ошибкам в хроматографии, о них нужно знать, чтобы не терять напрасно время на анализы, если эти ошибки всё-таки возникают. Наконец, вода – это среда, способствующая росту и распространению бактерий. В хроматографии фрагменты бактерий наблюдаются как случайные пики-«призраки». Соответственно, растворители всех указанных классов представляют собой потенциальный источник серьёзных ошибок в хроматографии.

УСТРАНЕНИЕ. Предотвратить ошибки, связанные с длительным хранением растворителей, можно трояко. Во-первых, изготовители растворителей сами принимают меры, добавляя в растворитель стабилизатор. К примеру, ТГФ обычно стабилизируют бутил-гидрокситолуолом (БГТ). Это увеличивает срок годности растворителя, однако, приводит к невозможности использовать ТГФ с УФ детекторами, поскольку БГТ сильно поглощает в диапазоне более 280 нм.

Во-вторых, изготовители растворителей обычно проставляют на этикетке неустойчивых растворителей срок годности. Этот срок варьирует от девяти месяцев до года от даты выпуска, также проставляемой на этикетке. По истечении срока годности растворитель не обязательно становится полностью непригодным к дальнейшему употреблению, однако в таких случаях нужно продумать, что более целесообразно: провести испытания растворителя или просто его не использовать.

В-третьих, запас растворителей в лаборатории или на складе никогда не должен превышать двухмесячного срока. Кроме того, на этикетках бутылей или на коробках следует указывать дату поступления на склад. Это позволяет организовать надлежащую ротацию запасов, так что более старые растворители расходуются первыми.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ Р 3. **Бутыли с растворителем или резервуары вовсе не маркированы или плохо маркированы**. К сожалению, это встречается гораздо чаще, чем можно было бы думать. Особенно часто бывает, что бутыли с заводскими этикетками повторно используют для смесей растворителей. Случается также, что эти бутыли используют для слива отработанной подвижной фазы, но не маркируют чётко «Отходы». Результаты могут быть какими угодно – от заметно изменившейся

хроматограммы до немедленного выхода из строя хроматографа (в зависимости от того, что было в бутыли).

УСТРАНЕНИЕ. Приготовление растворителя не заканчивается на этапе смешивания. Если в лаборатории работают несколько человек и у приборов также не один пользователь, нельзя ожидать, что они будут знать, что именно находится в немаркированных бутылях из-под растворителя. Избежать ошибок позволит соблюдение нескольких простейших правил:

1. Как только растворитель вылили из бутыли, бутыль следует очистить, а заводскую маркировку *удалить*. В этом случае тот, кто воспользуется бутылью потом, будет вынужден промаркировать её.
2. Ни в коем случае не следует использовать жидкость из немаркированной бутыли. Возможно, это отходы. Прохождение отработанного растворителя через хроматограф для ВЭЖХ может привести к необратимым повреждениям его элементов.
3. Необходимо всегда чётко маркировать резервуар с элюентом, указывая следующие данные: *состав элюента – полностью* (например, метанол-вода, объёмные доли 50:50 (буфер ацетатный, 20 мМ при pH=4), а не просто «буферный раствор метанол-вода»); *дата приготовления*; а также *инициалы лица, приготовившего элюент*.
4. Следует чётко маркировать соответствующим образом все бутыли с отходами.
5. Ни в коем случае не следует пытаться очистить бутыль для отходов и использовать её в дальнейшем.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Р 4. **После смены элюента в резервуаре он перестаёт поступать в хроматограф**. Принято считать, что процесс смены растворителя в бутыли простой и «бездумный». Обычно это так. Однако и здесь можно сделать две серьёзные ошибки: залить несмешиваемые или взаимно нерастворимые компоненты или сделать так, что в хроматограф попадёт воздух. Обе эти ошибки могут привести к тому, что подача подвижной фазы в хроматографе прекратится.

УСТРАНЕНИЕ. Процесс перехода на новый элюент определяется его исходным и конечным составом. Если нужно просто пополнить элюент или заменить резервуар на новый, содержащий элюент того же состава, ситуация относительно проста. Необходимо перекрыть поток. Аккуратно снять входной фильтр и трубопровод из пустого резервуара и переставить их в полный резервуар. При этом убедиться, что входной фильтр полностью погружён в элюент и находится у дна резервуара. Далее включить поток и

проследить, не выходят ли из входного фильтра пузырьки воздуха. Если пузырьки наблюдаются, прокачать насос, чтобы удалить воздух из системы.

Если же состав элюента меняется, процесс смены начинает требовать более пристального внимания. В этом случае нужно помнить, что промывке подлежат входной фильтр, трубопровод, соединяющий его с насосом, сам насос, мёртвый объём (между головкой насоса и инжектором), инжектор, колонка, все соединительные трубопроводы и детектор. Следует убедиться в том, что петля инжектора или шприц автоматического устройства ввода пробы также промыты достаточным количеством нового элюента. Далее следует описание порядка смены смешиваемых (и взаимно растворимых) растворителей.

Смена смешиваемых элюентов

1С. Отключить подачу насоса.

2С. Отключить колонку от хроматографа, открыв промывочный клапан насосной системы. Если промывочный клапан не предусмотрен, отсоединить трубопровод между головкой насоса и инжектором или между инжектором и колонкой. В ходе этого процесса колонка не должна оставаться в потоке. Под новый выходной трубопровод поставить стакан для сбора отходов.

3С. Залить около 100 мл нового элюента в чистую колбу Эрленмейера или стакан.

4С. Аккуратно перенести узел входного фильтра в новый элюент в колбе. Это будет препятствовать загрязнению нового элюента старым.

5С. Включить подачу элюента. Поскольку в потоке остались только элементы системы с малым перепадом давления, расход может быть большим (5 мл/мин и более). В хроматографах, где имеется штатная функция промывания, расход может составлять 10 мл/мин.

6С. Прокачать через хроматограф примерно пятикратный его внутренний объём, чтобы вымыть весь старый элюент из этой части системы. Отключить подачу.

7С. Перенести узел входного фильтра в резервуар с новым элюентом.

8С. Отключить промывочный клапан или пересоединить соответствующим образом трубопроводы. Включить подачу элюента с нормальным расходом через всю систему. Не использовать функцию промывания, поскольку сейчас в поток уже включена

колонка. Промыть остальные элементы пятикратным объёмом нового элюента, т.е. примерно пятикратным объёмом колонки.

Чтобы перейти на новый элюент в случае, если один из них содержит в растворённом виде компоненты, нерастворимые в другом (например, буфер или другие соли), следует придерживаться того же порядка действий, с той разницей, что нужно прокачать через насос, а затем через всю систему промежуточный растворитель, не содержащий солей. Итак, после операции 2С необходимо выполнить следующие действия.

2Са. Залить около 100 мл промежуточного растворителя, не содержащего солей, в колбу Эрленмейера или стакан (это тот же элюент, что в резервуаре, но без соли или модификатора).

2Сб. Аккуратно перенести узел входного фильтра в новый элюент в колбе. Это будет препятствовать попаданию соли из старого элюента в новый.

2Св. Включить подачу элюента.

2Сг. После того, как из колбы будет прокачан примерно пятикратный объём системы, отключить подачу, присоединить насос к остальной части хроматографа и прокачать элюент через систему. При этом будут удалены все осаждаемые вещества. Перейти к операции 3.

Если элюенты не смешиваются, но не содержат солей или присадок, которые могут осаждаться, следует использовать промежуточный растворитель, смешиваемый с обоими рабочими элюентами (например, ИПС или ацетон), как описано далее.

Смена несмешиваемых элюентов

1Н. Отключить подачу насоса.

2Н. Залить около 100 мл универсального растворителя в чистую колбу или стакан.

3Н. Аккуратно перенести узел входного фильтра в колбу с универсальным растворителем.

4Н. Включить подачу растворителя с расходом около 0,5 мл/мин или менее. Контролировать перепад давления. Если его значение становится слишком большим, уменьшить расход.

5Н. Прокачать через систему примерно пятикратный её объём, чтобы вымыть весь старый элюент из этой части установки. Отключить подачу. Заметим, что этот процесс можно ускорить, если вначале отключить колонку и перевести на универсальный растворитель

все элементы хроматографа до колонки, затем повторно присоединить колонку и включить насос на слабую подачу. Однако не следует забывать о необходимости промыть и колонку растворителем, прежде чем подать в систему новый элюент.

6Н. Залить около 100 мл нового элюента в чистую колбу Эрленмейера или стакан.

7Н. Включить подачу элюента с расходом около 0,5 мл/мин или менее. Контролировать перепад давления. Если его значение становится слишком большим, уменьшить подачу. Заметим, что этот процесс можно ускорить, если вначале отключить колонку и перевести на новый элюент все элементы до колонки. Затем повторно присоединить колонку и включить насос на слабую подачу.

8Н. Прокачать через систему примерно пятикратный её объём, чтобы вымыть весь универсальный растворитель из этой части установки. Отключить подачу.

9Н. Перенести узел входного фильтра в резервуар с новым элюентом.

Если элюенты не только несмешиваемы, но и один из них содержит компоненты, нерастворимые в другом, после операции 1Н необходимо выполнить следующие промежуточные действия.

1На. Залить около 100 мл элюент без добавок в чистую колбу Эрленмейера или стакан.

1Нб. Аккуратно перенести узел входного фильтра в колбу.

1Нв. Промыть систему при нормальном расходе.

1Нг. Прокачать через систему примерно пятикратный её объём, чтобы вымыть все добавки. Отключить подачу. Перейти к операции 2Н.

Смысл такой многоэтапной последовательности смены элюента в том, что при смешивании несмешиваемых или взаимно нерастворимых веществ может засориться входной фильтр, нарушиться работа обратных клапанов, могут загрязниться фритты, забиться поры колонки. Удаление осадка из резервуара и насоса затруднительно, трудоёмко, и его следует избегать. Насос и трубопроводы обычно очистить не так уж сложно. А вот восстановить колонку гораздо сложнее. Чтобы удалить несмешиваемые компоненты из пор нужно много времени и большое количество растворителя. В особо тяжёлых случаях колонку вообще не удаётся вернуть в работоспособное состояние.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Р 5. **Вскоре после смены состава элюента поток прекращается**. Помимо описанных выше причин (несмешиваемые элюенты, Р4 и РС9), к этому часто приводит попадание в систему при смене элюента воздушных пузырьков.

УСТРАНЕНИЕ. Воздушные пузырьки попадают в систему из-за того, что при переносе входного фильтра из резервуара в резервуар его роняют или переворачивают. При этом находящийся в фильтре растворитель вытекает, внутрь попадает воздух. Подобным же образом, если фильтр долго (свыше 10 мин) находится вне резервуара, растворитель медленно вытекает или испаряется, внутрь фильтра также попадает воздух.

Пузыри воздуха можно удалить из хроматографа, прокачивая элюент через насос и выводя его наружу через промывочный клапан. Если это не даёт нужного результата, необходимо снять трубопровод, идущий на входной обратный клапан и протянуть элюент через входной фильтр, создавая разрежение (обычно с помощью шприца или резиновой груши от пипетки через переходник). Как только жидкость начнёт свободно проходить через трубопроводы, присоедините обратный клапан на место и начинайте промывку.

3.4. Входные фильтры и дегазаторы

Входные фильтры для резервуаров хроматографов изготавливают (иногда) из спечённого стекла, чаще из нержавеющей стали. Типичное устройство этих элементов показано на рис. 3.21. Фильтры предназначены для удаления микрочастиц из растворителя перед поступлением в насос. Дело в том, что микрочастицы увеличивают трение плунжера о кольцевые уплотнения и могут привести к образованию царапин на плунжере. Поскольку не существует способов прямого контроля за степенью засорения входных фильтров, важно предусмотреть их регулярную замену в плане регламентных профилактических работ. Если фильтр засоряется, подача элюента в насос резко уменьшается, что вызывает несистематические ошибки в результатах хроматографии.

Дегазаторы используются для надлежащей дегазации элюентов до использования и в процессе работы. Они либо устанавливаются на резервуар с элюентом, либо представляют собой отдельные модули, как показано на рис. 1.3. Эти элементы также требуют регулярной профилактики.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ВФ 1. **На входном фильтре осаждаются загрязнения**. Поверхность входного фильтра на удивление велика, порой свыше 10 см^2. С течением времени на фильтре осаждаются из растворителя

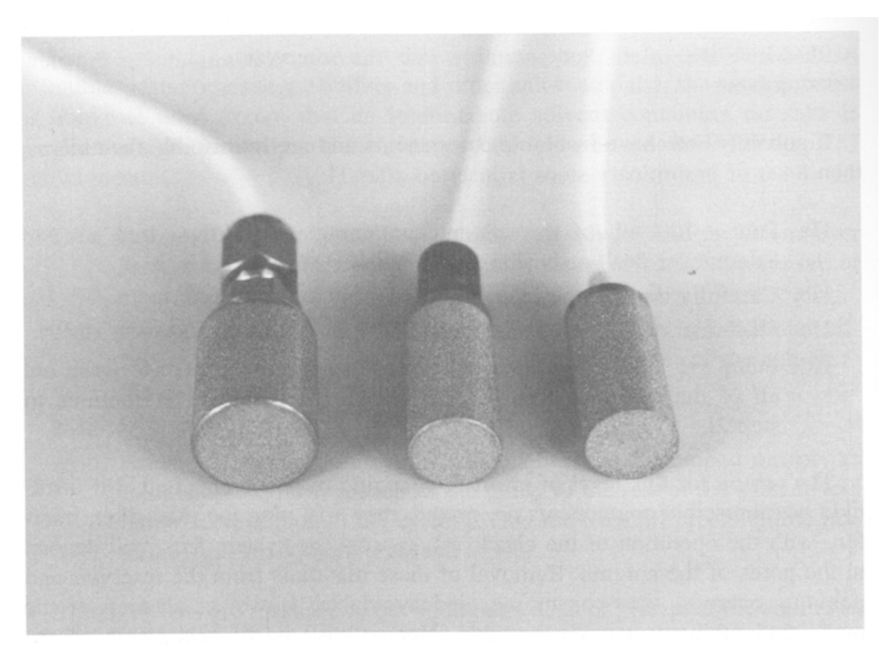


Рис. 3.21. Входные фильтры в трёх исполнениях. Слева направо: фильтр из нержавеющей стали с накидной гайкой на резьбе; пластмассовый фильтр с резьбой и фланцем; насадной фильтр из ПТФЭ. Фильтры могут также изготавливаться из стекла (редко) и ПТФЭ.

примеси, даже если их содержание весьма мало. Ещё хуже, если в качестве растворителя используется вода: внутри и снаружи фильтра развиваются бактерии. Рост бактерий зачастую ускоряют остатки ранее использованных подвижных фаз.

Осаждение загрязнителей на входном фильтре проявляется внешне двояко. Во-первых, если накопилось много загрязнителей, их фрагменты могут отрываться или десорбироваться и элюироваться через колонку. При этом возникают непредвиденные пики с различными временами удерживания и высотой (рис. 3.22). Во-вторых, элюирование может и просто прекратиться. В этом случае примеси осаждаются до тех пор, пока не засоряют поры фильтра. После этого поток растворителя через насос резко падает и начинает изменяться случайным образом. Поскольку подачу жидкости далеко не всегда постоянно контролируют, это проявляется как несоответствие времён удерживания расчётным, ненормально большие флуктуации времён удерживания, повышение перепада давления на хроматографе.

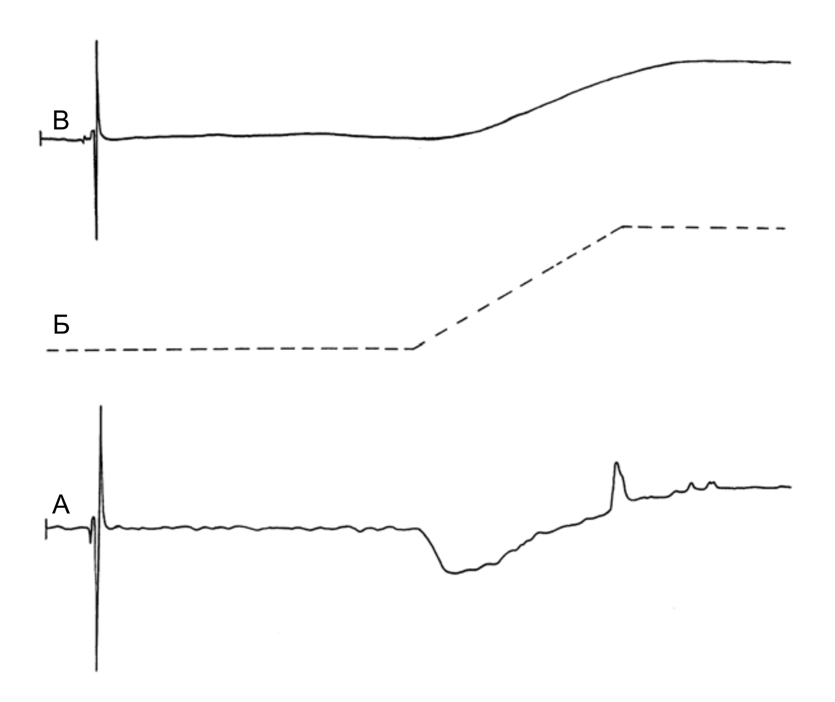


Рис. 3.22. (А) Хроматограмма иллюстрирующая проявление бактериального загрязнения на колонке C_{18}, (210 нм). В *холостом опыте* (т.е. когда в подвижную фазу вводят пробу подвижной фазы) в градиентном режиме с использованием смеси ацетонитрила с водой [профиль (Б)] наблюдаются неустойчивость нулевой линии и присутствуют пики на участке хроматограммы в процессе градиентного элюирования. Переход на свежую партию растворителя не устраняет ошибку. При использовании растворителя той же партии на другом хроматографе нулевая линия устойчива, побочных пиков нет. После очистки входных фильтров получена хроматограмма (В).

УСТРАНЕНИЕ. Входные фильтры подлежат регулярной замене или очистке. Если хроматограф используется интенсивно, необходимо производить замену или очистку фильтров с интервалом от 3 до 6 месяцев. Целесообразно совмещать это со сменой элюента или пополнением его запаса в резервуаре.

Чтобы очистить фильтр из нержавеющей стали, его следует обработать в течение 10 мин на ультразвуковой бане с погружением в смесь равных объёмных долей воды и HNO_3. После обработки тщательно промыть метанолом (при работе с азотной кислотой соблюдайте меры предосторожности. Перед работой ознакомьтесь с Руководящими указаниями Управления производственной санитарии и гигиены). Уточните, какая методика очист-

ки предложена изготовителем. Не советует без крайней необходимость пользоваться мылом и моющими средствами, поскольку в них содержатся поверхностно-активные и другие вещества, которые очень трудно удалить с внутренней поверхности фильтра. Кроме того, ранее не использовавшиеся фильтры из нержавеющей стали могут нуждаться в пассивировании или промывании перед работой. Здесь также можно предложить обработку на ультразвуковой бане в разбавленной азотной кислоте с последующим промыванием метанолом.

Чтобы предотвратить рост бактерий в резервуаре и входном фильтре, по возможности, следует избегать применения чистой воды или растворителей с высокой концентрацией воды. Например, водный раствор с объёмными долями 20 % метанола или 15 % ацетонитрила эффективно препятствует росту бактерий. Однако эти меры совсем не предотвращают накопление осадка. Аналогично, буферы с низким (менее 4) или высоким (свыше 8) pH отчасти тормозят рост бактерий, но также не совсем ему препятствуют. Более того, буферы как раз и являются главным источником осаждения бактерий на фильтрах. Если вышеуказанные условия соблюсти невозможно, главной мерой защиты против накопления бактерий будет очень частая очистка резервуара, либо регулярная очистка или замена входного фильтра (раз в месяц или даже чаще).

Простой способ борьбы с неприятностями такого рода – внедрить и соблюдать график регламентных профилактических работ. Продолжительность простоя прибора можно свести к минимуму, если предусмотреть запасной комплект входных фильтров. При установке нового входного фильтра следует помнить, что в новых фильтрах всегда имеется значительное количество воздуха, который не должен попасть в колонку и детектор. Часто оказывается полезным залить фильтр перед установкой (например, поместив его в стакан с элюентом и обработав на ультразвуковой бане в течение 5 мин). Затем следует демонтировать использованные фильтры и установить чистые. Далее нужно промыть систему и соединить резервуар с насосом, и лишь затем подключать колонку и детектор.

После смены фильтров старые фильтры можно очистить и подготовить к повторному использованию в соответствии с графиком. Эффективный способ очистки – обработка на ультразвуковой бане в разбавленной азотной кислоте с последующим промыванием метанолом. После очистки входные фильтры необходимо поместить в герметический контейнер, чтобы исключить загрязнение при хранении. Неплохо также периодически заменять трубопровод между входным фильтром и входным обратным клапаном. Благодаря этому предотвращается возможность накопления загрязнений в этом элементе системы и его блокирования.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ ВФ 2. **Проницаемость трубок из фторопласта для кислорода**. Хотя это редко приводит к ошибкам, следует помнить, что фторопласт проницаем для кислорода. Вероятнее всего это свойство может сказаться, если используются электрохимические детекторы. Нештатные ситуации чаще всего возникают, если используются тонкостенные трубки. Наличие кислорода в элюенте чаще всего вызывается медленным просачиванием воздуха в резервуар сквозь уплотнители.

УСТРАНЕНИЕ. В случае применения электрохимических детекторов, следует использовать толстостенные фторопластовые трубки. После дегазации необходимо помещать растворитель под слой инертного газа.

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ ВФ 3. **Влияние вакуумных дегазаторов. Эффекты, связанные со свойствами элюентов**. Хотя дегазировать элюент лучше всего до поступления в насос, проходные дегазаторы в трубопроводе перед ним также могут стать источником ошибок. Дегазатор представляет собой полупроницаемую * трубку, помещенную в вакуум, по которой элюент поступает в насос. Во-первых, если скорость потока слишком мала или разрежение слишком велико, состав элюента может измениться, поскольку содержащиеся в малых количествах летучие модификаторы испарятся. Например, часто к подвижной фазе добавляют в качестве модификатора 0,1 % трифторуксусной кислоты, чтоб снизить pH растворителя (а растворимые вещества удерживать в протонированном состоянии). Если модификатор улетучится, pH растворителя изменится, что может радикально сказаться на хроматограмме (см. выше рис. 3.19).

Во-вторых, следует удостовериться, что материал пористой трубки в дегазаторе совместим с элюентом. Изготовители фильтров публикуют таблицы совместимости для своих материалов. Краткая сводка по совместимости приведена в таблице 3.3. Если фильтр растворится, это будет иметь катастрофические последствия – забьются входные фильтры, трубопроводы, инжектор, поры колонки.

УСТРАНЕНИЕ. Необходимо убедиться в том, что разрежение, создаваемое для дегазации элюента, достаточно, но не избыточно. Следует часто пополнять или заменять элюент свежеприготовленным. Необходимо включить замену полупроницаемых трубок дегазатора в план регламентных профилактических работ. Для каждого растворителя необходимо удостовериться в совместимости его материала, в соответствии с таблицами совместимости производителя.

---

* *Проницаемую для газов, но не для жидкости (прим. редактора)*

ПРИЧИНА ВОЗМОЖНОЙ ОШИБКИ ФВ 4. **Проходной дегазатор как возможный источник загрязнений**. Ещё одной причиной ошибки при использовании дегазаторов на пути элюента в насос может стать длительный простой хроматографа в случае применения растворителя, содержащего соли. В этом случае при испарении элюента в трубках дегазатора начинается процесс образования кристаллов, т.е. осаждение в них солей. Это приводит к хаотическим изменениям времён удерживания. Устранить эту неисправность обычно трудно. Кроме того, загрязнители накопившиеся в трубках дегазатора или вымывающиеся из трубок при неправильном хранении, могут давать случайные пики на хроматограмме.

УСТРАНЕНИЕ. Если хроматограф предполагается надолго законсервировать, необходимо прокачать через него элюент, совместимый с рабочим, но не содержащий солей. В случае предыдущего длительного хранения дегазатора, следует заменить фильтр на новый, чтобы исключить вероятность попадания в хроматограф загрязнителей, которые могли осесть в трубках дегазатора из воздуха.

Также, чтобы уменьшить вероятность попадания в хроматограф загрязнителей, адсорбированных материалом трубок, целесообразно их заполнить растворителем.

3.5. Блок насосов

Далее рассматриваются те детали и узлы насосов, к которым хроматографист имеет доступ. К их числу относятся входной и выходной обратные клапаны, плунжер и его уплотнения, а также головка насоса.

3.5.А. Обратные клапаны

В большинстве хроматографов для ВЭЖХ обратные клапаны задают направление потока элюента в системе. Рис. 3.23 иллюстрирует их работу в цикле хода плунжера. Вначале плунжер вытягивается из головки насоса (*обратный ход*). При этом происходят следующие четыре процесса. Во-первых, перекрывается выходной обратный клапан, так что подвижная фаза не поступает в насос со стороны колонки. Иначе говоря, этот клапан предотвращает обратное течение потока в системе. Во-вторых, одновременно с перекрытием выходного обратного клапана, на обратном ходе плунжера открывается входной обратный клапан, так что элюент из резервуара всасывается в головку насоса. В-третьих, полость в головке насоса заполняется свежей порцией элюента. Наконец, в-четвёртых, плунжер доходит до крайнего положения, чтобы в дальнейшем выполнить полный рабочий ход.

Таблица 3.3.
Совместимость распространённых материалов трубок дегазатора и растворителей

Растворитель	Совместимость				
	Ацетат целлюлозы	Нитроцеллюлоза	Нейлон	ПВДФ[а]	ПТФЭ[б]
Азотная кислота концентрированная	Н[д]	У[в]	Н	Н	Р[г]
Азотная кислота разбавленная	У	У	Н	Н	Р
Аммиак водный	Р	Р	Р	Р	Р
Ацетон	Н	Н	Р	Н	Н
Ацетонитрил	Н	Н	У	Р	Р
Гексан	Р	Р	Р	Р	Р
Раствор гидроокиси натрия	Н	Н	Р	Р	Р
Диметилацетамид	Н	Н	Р	Н	Р
Диметилсульфоксид	Н	Н	У	Р	Р
Диметилформамид	Н	Н	Р	Р	Р
Дихлорметан	Н	У	У	Р	Р
Диэтиловый эфир	Н	У	У	Р	Р
Изопропиловый спирт (ИПС)	Р	Р	Р	Р	Р
Метанол	Р	Н	Р	Р	Р
Метилэтилкетон	Н	Н	У	Р	Р
Перекись водорода (30 %)	Р	Р	Н	Р	Р
Пиридин	Н	Н	Р	У	Н
Соляная кислота концентрированная	Р	Н	Н	Р	Н
Соляная кислота разбавленная	Н	Р	У	Р	Р
Тетрагидрофуран (ТГФ)	Н	Н	Н	Р	Р
Толуол	Р	Р	Р	Р	Р
Трифторуксусная кислота разбавленная	У	У	У	У	Р
Уксусная кислота разбавленная	У	Р	Р	Р	Р
Фосфорная кислота разбавленная	Р	Р	Н	Р	Р
Хлороформ	Н	Р	У	Р	Р
Этанол	Р	Н	Р	Р	р
Этилацетат	Н	Н	Р	Р	Р

[а] ПВДФ: поливинилиденфторид;
[б] ПТФЭ: политетрафторэтилен (иначе фторопласт или тефлон®);
[в] У: рекомендуется условно, необходимы предварительные испытания;
[г] Р: рекомендуется, устойчив;
[д] Н: не рекомендуется, неустойчив.

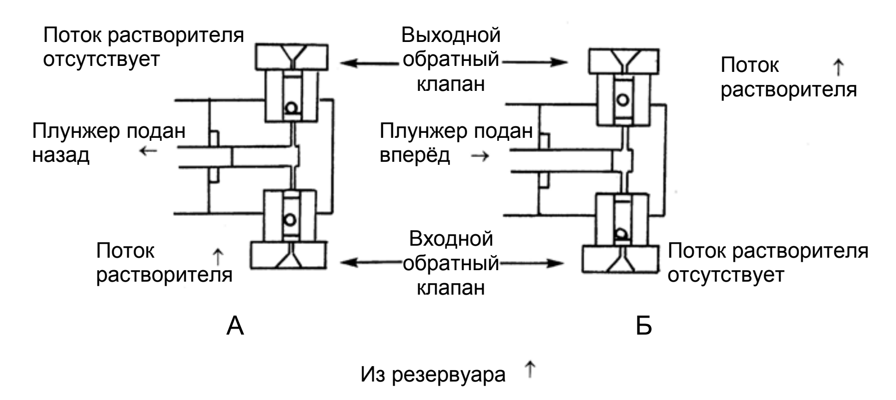


Рис. 3.23. (А) Работа обратных клапанов на обратном ходе плунжера. Головка насоса заполняется подвижной фазой. Шарик верхнего обратного клапана поджат, клапан препятствует вытягиванию растворителя из колонки во встречном направлении. (Б) Работа обратных клапанов при рабочем ходе плунжера. Шарик нижнего обратного клапана поджат, клапан препятствует выдавливанию растворителя обратно в резервуар. Следует отметить, что в обоих случаях клапаны препятствуют прохождению растворителя в неправильном направлении.

Как только полость заполнилась свежим растворителем, плунжер вталкивается в головку с точно регулируемой скоростью. Эта скорость определяется тем, какой установлен расход. При продвижении плунжера вперёд входной обратный клапан перекрывается, так что подвижная фаза не возвращается в резервуар. Выходной обратный клапан открывается, элюент подаётся в колонку. Подача продолжается, пока плунжер не выдвинется на полную длину и на этом подача растворителя в систему прекращается. Далее следует опять обратный ход плунжера, и цикл повторяется.

В современных насосах обычно используются двухплунжерная конструкция или компенсирующий плунжер. Два плунжера работают в противофазе так, что, когда один из них выполняет обратный ход, второй подаёт растворитель. В этом случае пульсации давления в установке будут весьма малы. Компенсационный плунжер подаёт растворитель лишь на малом участке обратного хода основного плунжера.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Н 1. **Подача меняется случайным образом, в трубопроводе между резервуаром и насосом образуются пузырьки**. Очистка входного фильтра и т.п. не дают желаемого результата.

УСТРАНЕНИЕ. Нестабильность потока элюента может быть обусловлена множеством причин, однако одна из них, о которой чаще всего не

вспоминают, – это неправильное расположение резервуара относительно головки насоса. Общее правило состоит в том, что резервуар (точнее, уровень жидкости в резервуаре) должен находиться выше уровня головки насоса. Тем самым обеспечивается небольшое положительное давление на входном обратном клапане. Система действует, как сифон, способствуя подаче жидкости.

Если элюент находится ниже уровня головки насоса, насосу приходится протягивать весь столб растворителя вверх по трубопроводу, что гораздо хуже. Действительно, если принять в расчёт массу элюента, особенно если растворитель имеет высокую плотность и малый коэффициент поверхностного натяжения, как, например, хлороформ или дихлорметан, столб растворителя в этих обстоятельствах будет разрываться, что приведёт к появлению воздушных пузырей в трубопроводе. К сожалению, то же самое происходит в распространённых растворителях – ацетонитриле и метаноле.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Н 2. **Времена удерживания изменяются случайным образом; все времена удерживания сдвигаются на одну и ту же величину**. Обычно эта ошибка вначале проявляется в виде малых отклонений, но времена удерживания выходят за предполагаемый рабочий диапазон. Кроме того, появляются флуктуации перепада давления. Чаще всего причину следует искать в одной или нескольких областях: загрязнение входного фильтра (см. ВФ1), течи в фитингах трубопроводов, нарушение работы обратных клапанов.

УСТРАНЕНИЕ. Если времена удерживания сдвигаются, одна из первых мер, которые нужно принять, – замерить истинный объёмный расход на выходе детектора. Проще всего для этого замерить время, необходимое, чтобы заполнить точно мерный стакан ёмкостью 10 мл. Или можно сливать жидкость с выхода в градуированный стакан в течение определённого времени, а затем замерить объём. Второй подход значительно менее точен. Однако для упрощённой диагностики это – самый быстрый и простейший подход.

Если поток через хроматограф меньше ожидаемого, следует осмотреть визуально все элементы на предмет наличия течей или их признаков, в особенности вокруг всех соединений и фитингов трубопроводов. Необходимо помнить, что некоторые из соединений в хроматографе находятся вне поля зрения (за приборными панелями, под крышками и пр.). Чтобы определить, имеется ли течь и, если да, то где именно, нужно последовательно демонтировать отдельные элементы хроматографа. Например, если расход растворителя через систему мал, возможно, течь находится внутри детектора, и в этом случае обнаружить её визуально невозможно. Чтобы опре-

делить наличие течи в этом элементе, нужно отсоединить детектор и проверить величину расхода через все элементы до детектора. Если расход не изменился, значит, течь находится не в детекторе, следовательно, нужно последовательно продолжать демонтировать элементы хроматографа.

Если течи не обнаружены, необходимо проверить, как меняется давление при нескольких ходах плунжера насоса. Если в насосе имеется пузырь воздуха, это зачастую проявляется, как необычно большое изменение давления в цикле работы насоса. Поскольку воздушная полость подвержена сильному сжатию, в начальной части рабочего хода плунжера перепад давления обычно ниже. После того, как воздушная полость полностью сжата, начинается нагнетание, элюент наконец поступает в колонку. Чтобы устранить эту неисправность, необходимо промыть головку насоса. Во многих современных насосах предусмотрен режим промывания. Если он не предусмотрен, аккуратно нужно отсоединить трубопровод от выходного обратного клапана. Промыть головку насоса. Далее необходимо следить за выходом пузырьков воздуха из обратного клапана. Если это не даёт нужного результата, стоит попытаться создать небольшое разрежение, продолжая подачу элюента насосом на уровне от 1 до 2 мл/мин. Для этой цели нужно иметь переходник от обратного клапана к шприцу ёмкостью 5 или 10 мл. Когда насос подаёт растворитель, медленно вытянуть поршень шприца. По окончании промывки повторно замерить расход.

Если течи визуально не обнаруживаются, а доказательств наличия внутренних течей нет, весьма вероятно, что либо начал засоряться входной фильтр, либо обратные клапаны не работают, как следует. Если имеются запасные обратные клапаны, следует установить их вместо старых. Чаще всего замене подвергаются только внутренние элементы клапанов (трубка, шарик, седло), т.е. их устанавливают в корпуса, которые остаются присоединёнными к головке насоса. Чтобы заменить обратный клапан целиком, надо демонтировать его с головки насоса в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Действовать нужно очень осторожно, преодолевая усилие на головке насоса, чтобы не деформировать плунжер.

После того, как новый обратный клапан смонтирован надлежащим образом, необходимо пересоединить трубопровод, идущий от резервуара, убедиться, что трубопровод полностью заполнен элюентом (т.е. в нём нет пузырьков воздуха). В некоторых насосах на этом этапе предусмотрена специальная операция заливки, с помощью которой система подготавливается к работе поэтому следует выполнить соответствующие операции.

В насосах более старых конструкций или в насосах, для которых не предусмотрена программа автоматического промывания, заливка обратных

клапанов выполняется по-другому. Однако и здесь важно, чтобы в трубопроводе от резервуара к насосу не было пузырьков. Пока насос не подключён выходным обратным клапаном к системе, необходимо удалить воздух из нового обратного клапана. Для этого вначале надо включить насос и наблюдать за вытеканием растворителя из выходного обратного клапана. По мере того, как удаляется воздух из входного обратного клапана, в потоке из выходного обратного клапана появляются пузырьки. Если в обратном клапане образуется воздушная пробка, необходимо создать небольшое разрежение (например, с помощью сжатой резиновой груши от пипетки надетой на выходной обратный клапан. Её необходимо понемногу отпускать, пока насос работает на небольшой подаче). Как только весь воздух удалён, присоединить выходной обратный клапан к системе и замерить расход.

Если новых обратных клапанов нет или нужно очистить клапаны для последующего повторного использования, рекомендуется следующая методика очистки. Вначале надо уравновесить насос элюентом, не содержащим ни буферов, ни модификаторов подвижной фазы. Демонтировать обратные клапаны с головки насоса. Затем, если обратный клапан работал в растворителе для обращённо-фазной хроматографии, смешиваемом с метанолом:

1. Обработать в ультразвуковой бане в метаноле (продолжительность обработки на каждом этапе не менее 5 мин). Промыть водой.
2. Обработать на ультразвуковой бане в смеси HNO_3 с водой в равных объёмных долях. На этом этапе из клапанов будут удалены соли. Промыть водой (следует обратить внимание на соблюдении мер предосторожности при работе с HNO_3. Перед работой с концентрированной азотной кислотой нужно изучить Руководящие указания Управления производственной санитарии и гигиены. Проверить совместимость материала клапанов с разбавленной кислотой по документации фирмы-изготовителя).
3. Обработать в ультразвуковой бане в ИПС.
4. Обработать в ультразвуковой бане в дихлорметане.
5. Обработать в ультразвуковой бане в гексане.
6. Обработать в ультразвуковой бане в ИПС.
7. Обработать в ультразвуковой бане в метаноле и дать высохнуть на воздухе.

Если клапан работал в растворителе для нормально-фазной хроматографии (опять-таки, первоначально нужно уравновесить систему с растворителем, не содержащим модификаторов):

1. Обработать в ультразвуковой бане в гексане.
2. Обработать в ультразвуковой бане в дихлорметане.
3. Обработать в ультразвуковой бане в ИПС.
4. Обработать в ультразвуковой бане в метаноле.
5. Обработать в ультразвуковой бане в смеси HNO_3 с водой в равных объёмных долях. На этом этапе будут удалены соли. Промойте водой следует обратить внимание на соблюдении мер предосторожности при работе с HNO_3. Перед работой с концентрированной азотной кислотой нужно изучить Руководящие указания Управления производственной санитарии и гигиены. Проверить совместимость материала клапанов с разбавленной кислотой по документации фирмы-изготовителя).
6. Обработать в ультразвуковой бане в метаноле и дать высохнуть на воздухе.

В заключение заметим, что во многих конструкциях обратных клапанов предусмотрена наружная прокладка, предотвращающая течь между внутренней сборкой и корпусом. Визуальным осмотром этого элемента можно обнаружить наличие трещины. Если трещина имеется, герметизация не обеспечивается, соответственно, нарушается стабильность потока элюента. В этом случае необходимо заменить прокладку.

Обычно обратные клапаны выходят из строя при частой смене элюента. Как правило, это происходит в лабораториях, активно занимающихся разработкой методик. Две наиболее распространённые причины неисправности – переход от элюента для нормально-фазной хроматографии на элюент для обращённо-фазной хроматографии без надлежащего промежуточного растворителя и неполное удаление несовместимых элюентов (несмешиваемых растворителей или нерастворимых модификаторов подвижной фазы) до перехода на новый.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Н 3. **Разрушение и износ кольцевых уплотнений плунжера и нестабильная подача**. Течи также могут возникать вокруг головки плунжера насоса. Если кольцевое уплотнение плунжера изношено, жидкость во время рабочего хода насоса продавливается между плунжером и кольцом. На начальном этапе это заметить трудно, поскольку просачивается очень небольшое, по сравнению с общей подачей, количество растворителя, а область, где может наблюдаться течь вокруг головки насоса, велика. Однако, по мере износа уплотнения, скорость просачивания увеличивается. Как правило, на это обращают внимание, когда в картере

под готовкой насоса появляются признаки увлажнения или появления солей.

УСТРАНЕНИЕ. Если обратные клапаны недавно заменили или очистили, а подача, тем не менее, становится нестабильной, возможно, износилось кольцевое уплотнение плунжера. Поэтому весьма разумно при каждой очистке или смене обратных клапанов заменять и уплотнение плунжера, а также очищать сам плунжер.

Замену кольцевого уплотнения плунжера насоса необходимо производить в строгом соответствии с инструкцией изготовителя. Далее следует общее описание последовательности действий. Включить насос на слабую подачу, дождавшись, пока плунжер полностью осуществит рабочий вход (полностью втянется), и остановить насос. Необходимо, чтобы как можно меньшая длина плунжера была вне кольцевого уплотнения, что, в свою очередь, сводит к минимуму вероятность повреждения плунжера при снятии уплотнения или установке нового. Далее следует демонтировать трубопроводы входного и выходного обратных клапанов. При демонтаже трубопроводов нужно обязательно удерживать корпуса клапанов на месте вторым гаечным ключом. Затем снять головку насоса, осторожно сдвигая её с плунжера. Перемещать головку насоса следует строго по прямой и точно по оси плунжера. Любое вертикальное или боковое усилие, приложенное к плунжеру во время снятия головки может привести к поломке плунжера.

Прежде, чем снять кольцевое уплотнение, следует помнить, в каком положении оно находится (уплотнения чаще всего имеют разные переднюю и тыльную поверхности, т.е. нужно правильно устанавливать их; см. рис. 3.24). Осторожно, чтобы не поцарапать никакие поверхности, снять кольцо плунжера. Для снятия и установки кольцевых уплотнений может потребоваться специальное приспособление, поставляемое изготовителем.

Затем необходимо осмотреть внутреннюю поверхность головки насоса. Во многих устройствах между плунжером и головкой имеются пластмассовое уплотнение или специальная прокладка. Убедиться, что прокладка цела. Внимательно осмотреть её на предмет налёта или кристаллических отложений. Прежде, чем установить новое кольцо и присоединить головку насоса, очистить открытые элементы, а именно, внутреннюю часть головки и плунжер. Полость головки насоса нужно промыть растворителем, например, ацетоном или ИПС. Если необходима более интенсивная чистка, например, с помощью ватного тампона, следует убедиться, что внутри головки не остаётся волокон. Снова промыть детали летучим растворителем, например, ацетоном или метанолом. Дать головке просохнуть на воздухе. Установить кольцевое уплотнение на плунжер в правильном положении и в

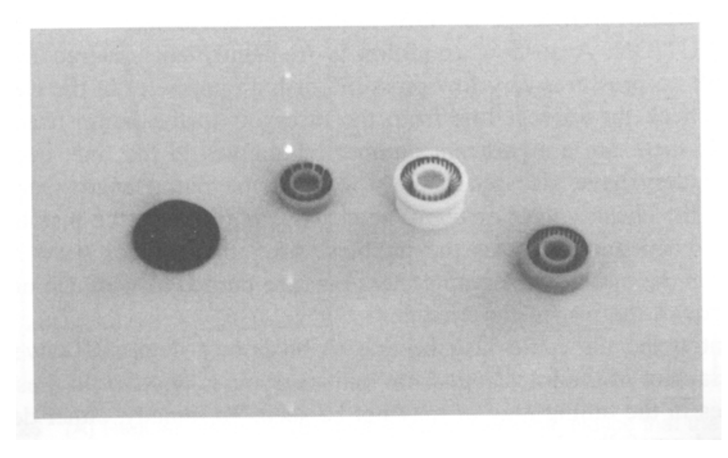


Рис. 3.24. Кольцевые уплотнения плунжеров. Следует обратить внимание на то, что их форма и толщина различны. Уплотнение слева на рисунке также имеет хорошо заметный фланец.

нужном месте. Устанавливать кольцо следует аккуратно, чтобы оно вошло в головку насоса прямо и без перекоса.

Прежде, чем окончательно собрать насос, нужно очистить плунжер. Пока головка не установлена, нужно включить насос и дождаться, пока плунжер максимально выдвинется из головки насоса. Чистой мягкой ветошью, смоченную ИПС, *осторожно* провести вдоль плунжера. Осторожно, чтобы не поцарапать плунжер! После очистки проверить, нет ли на поверхности плунжера задиров или других повреждений. Включить насос и дождаться, пока плунжер максимально втянется в головку насоса. Смочить оставшийся снаружи кончик плунжера ИПС, чтобы было легче надеть кольцевое уплотнение. Аккуратно установить на место головку насоса (при этом усилие должно прилагаться строго по оси плунжера и равномерно).

Поставить на место обратные клапаны. При закреплении трубопроводов на клапанах обязательно придерживать клапан вторым гаечным ключом против усилия закручивания. Присоединить трубопровод сначала ко входному обратному клапану, выполнить заливку насоса, присоединить трубопровод к выходному клапану. Не устанавливая колонку, выполнить промывание насоса. Замерить расход, как описано выше.

Если функция промывания в системе не предусмотрена, присоединить резервуар с растворителем ко входному обратному клапану. Выходной трубопровод пока к выходному клапану не подключать. Включить насос. Наблюдать за выходом пузырьков воздуха из выходного клапана. Как только

пузырьки перестанут выходить, на короткое время увеличить подачу до 5 мл/мин. Убедиться в том, что в это время пузырьки не появляются. Как только воздух полностью удалён из готовки насоса, можно остановить насос и присоединить трубопровод к выходному клапану.

Если в результате стабильность потока не достигнута, возможно, что-то не в порядке с механической или электрической частью насоса. Например, некоторые изготовители хроматографов используют электромагнитные клапаны регулирования состава, которые со временем изнашиваются или начинают функционировать неправильно. Обычно диагностировать этот источник ошибки можно, если переключить состав растворителя со 100 % А на 100 % Б и наблюдать за подачей из отдельных резервуаров. Если по отдельности подача каждого растворителя нормальная, переключить на смесь 50:50 и замерить расход. Если ошибка связана с клапаном регулирования состава, её легко выявить этими простейшими испытаниями.

Узел головка насоса и обратные клапаны должны подвергаться регулярным регламентным профилактическим работам. На основании опыта можно считать, что при интенсивной загрузке установки для ВЭЖХ кольцевые уплотнения плунжеров нуждаются в замене каждые полгода. Если используются агрессивные растворители, уплотнения нужно заменять каждые три месяца. Обратные клапаны, как правило, не требуют столь частого обслуживания, но целесообразно периодически их заменять, совмещая это с ремонтом или профилактикой насоса.

По меньшей мере один изготовитель установок для ВЭЖХ, фирма Хьюлетт-Паккард, помещает в выходной обратный клапан фильтр из пористого фторопласта. Так же, как в случае входного фильтра в резервуаре с растворителем, засорение этого фильтра приводит к нарушению нормальной подачи. Фильтр нуждается в регулярной замене, которую целесообразно совмещать с заменой уплотнений плунжера. Замену фильтра нужно также включить в график регламентных профилактических работ.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Н 4. **Плунжер совершает возвратно-поступательное движение, но подвижная фаза не подаётся**.

УСТРАНЕНИЕ. Чаще всего такое случается в сочетании с отсутствием давления, крайне низким значением давления или высоким давлением. Если давления нет, нужно проверить трубопровод между резервуаром и головкой насоса на наличие пузырьков воздуха. Если в линии много воздуха, даже в виде небольших пузырьков, весьма вероятно, что воздух проник и в головку насоса. Как только воздух попал в головку или обратные клапаны, подача прекращается, поскольку плунжер просто сжимает и разрежает воздух. После удаления воздуха из трубопровода требуется промыть насос;

для этого следует отключить его от остальных элементов установки, чтобы туда не попал воздух.

Воздух может также попасть в систему из плохо дегазированного элюента или вследствие неосторожного обращения с входным фильтром при его переносе из резервуара в резервуар. В этом случае пузырьки воздуха в трубопроводе могут быть, а могут и не быть заметны. Чтобы устранить неисправность, необходимо дегазировать элюент и, аккуратно поместив входной фильтр в новый резервуар или долив элюент в резервуар, установить резервуар выше уровня насоса.

Ещё одна причина появления воздуха в системе – слишком низкий уровень жидкости в резервуаре. Многие входные фильтры продолжают действовать, даже когда уровень растворителя падает ниже материала фритты. Но в какой-то момент в систему неминуемо начнёт всасываться воздух. Неприятное свойство резервуаров для элюентов состоит в том, что для полного погружения фритты нужно довольно много (иногда около 100 мл) жидкости. Одна из возможностей устранить этот недостаток – изготовить бутыль с воронкообразным дном (рис. 3.25). В этом случае входной фильтр

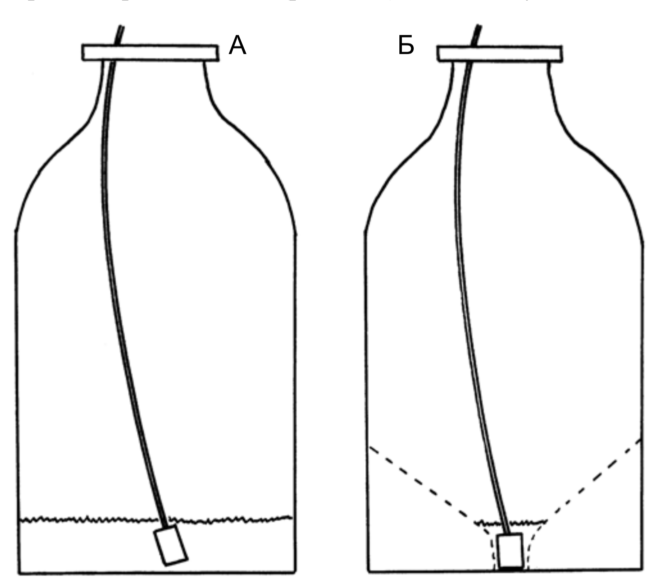


Рис. 3.25. (А) Обычный резервуар. (Б) Резервуар с воронкообразным дном. Следует обратить внимание на то, что минимальный объём растворителя, необходимый, чтобы полностью покрыть фритту входного фильтра, в обычном резервуаре в несколько раз больше, чем в резервуаре с воронкообразным дном.

попадает в воронку, и, чтобы покрыть его, нужно совсем немного элюента (обычно менее 25 мл). Впрочем, резервуар с воронкообразным дном имеет два недостатка: (1) он гораздо дороже, чем аналогичный с плоским дном; (2) барботирование элюента невозможно примерно для последних 100 мл, поскольку в воронке не помещается ничего, кроме входного фильтра.

Наконец, воздух может попасть в систему, если уровень жидкости падает ниже уровня головки насоса или ниже уровня входного фильтра.

Подача элюента может отсутствовать и при очень низком давлении. В некоторых хроматографах контролируется не только максимальный, но и минимальный перепад давления. Если нижний предел давления установлен слишком большим, а расход – слишком малым, или установлена более короткая колонка с большим размером зёрен, или используется новый элюент, вязкость которого значительно меньше, чем у предыдущего, может произойти аварийная остановка хроматографа. В этом случае, обязательно нужно перепрограммировать указанное предельное значение, если будут изменены какие-то из этих элементов или параметров. Можно также, как вариант, задать нулевой нижний предел перепада давления.

Отсутствие подачи растворителя может быть обусловлено и высоким перепадом давления. Чаще всего это происходит из-за засорения колонки, её нормального старения или непредвиденно высокой вязкости смеси в градиентном режиме. Устранение неисправностей, связанных с засорением колонки, рассмотрено в разделе «Нештатная ситуация К6». Не следует забывать, что в большинстве приборов после аварийной остановки из-за превышения допустимого перепада давления необходима принудительная инициализация. В этом случае до запуска насоса нужно вручную удалить параметры, на основании которых хроматограф был остановлен, для чего зачастую требуется перезапуск, а потом включить прибор в режим поиска и устранения неисправностей.

3.6. Насыщающие предколонки и проходные фильтры

Насыщающие предколонки используются, если элюент агрессивен по отношению к материалу сорбента аналитической колонки. Соответственно, такие предколонки почти всегда применяют, если элюент имеет очень высокий или очень низкий pH или содержит соли в большой концентрации. Хотя существует множество конструктивных вариантов, по сути, предколонка – это короткая колонка (например, длиной 50 мм, внутренним диаметром 4,6 мм) с той же основой (например, силикагель или оксид алюминия) и теми же производными функциональными группами поверхности, что и аналитическая колонка.

Главное отличие насыщающей предколонки от аналитической в том, что предколонка набита более дешёвым материалом с более крупным зерном. Пористый материал набивки предколонки часто состоит из частиц неправильной формы размером от 40 до 60 мкм, тогда как в аналитических колонках набивка осуществляется пористыми сферическими зёрнами диаметром 5 мкм. Предколонку заполняют вручную сухим материалом набивки насыпным методом, аналитическую же колонку – под давлением, используя суспензию материала набивки в растворителе в строго дозированном количестве. Насыщающая предколонка, которой сознательно жертвуют, имеет низкую эффективность, а аналитическая колонка высокоэффективна и используется для разделения. Наконец, аналитические колонки изготавливают только специалисты, и такие колонки, как правило, в 10, а то и 100 раз дороже, чем предколонки набитые кустарным способом в лаборатории. Поскольку трубки и фитинги для изготовления предколонок используются те же, что для аналитических, необходимо наносить на предколонки этикетки с чёткой маркировкой, чтобы случайно не перепутать их с аналитическими.

Рассмотрим сходство и различия насыщающих предколонок и аналитических колонок более подробно. К примеру, допустим, что аналитическая колонка содержит основу C_8 с привитой фазой, блокированием остаточных групп и сферическим зерном диаметром 5 мкм. В этом случае для предколонки также следует использовать основу C_8 (но без энд-кэппинга). Размер частиц набивки может быть от 40 до 60 мкм, удельная поверхность – от 200 до 300 $м^2/г$. Те, кто знаком с методом твердофазной экстракции (ТФЭ) при подготовке проб, узнают по этим параметрам материал, используемый в колонках для ТФЭ. Это очень удобно, поскольку не требуется отдельно приобретать материал набивки отдельно – можно просто извлечь набивку из колонки для ТФЭ и перенести её в предколонку.

Когда насыщающая предколонка набита, и фитинги закреплены, её устанавливают между головкой насоса и инжектором. Это очень удобное место для установки, поскольку теперь датчик давления контролирует также перепад давления на предколонке. Если колонка засоряется или стареет, перепад давления на ней входит как составляющая в общее давление в системе в целом.

Некоторые хроматографисты помещают насыщающую предколонку между головкой насоса и датчиком давления. В этом случае перепад давления на предколонке не контролируется. Соответственно, необходимо регулярно менять набивку предколонки, иначе перепад давления на ней может стать таким высоким, что будет повреждён плунжер насоса.

После установки насыщающей предколонки на место через неё прокачивают с большим расходом сильную подвижную фазу. Чаще всего как сильные растворители используют ацетонитрил и метанол (на этом этапе кондиционирования насыщающей предколонки убедитесь, что отработанный растворитель поступает в накопитель отходов и не проходит ни через инжектор, ни через колонку). На этом этапе достигаются три цели. Во-первых, из предколонки удаляется воздух. Во-вторых, из набивки удаляется вся «пыль». В-третьих, вымываются все адсорбированные органические вещества. После кондиционирования снимают фитинг в головной части колонки и заполняют полость материалом набивки. Затем необходимо повторить кондиционирование колонки и установить её в хроматограф.

Проходные фильтры устанавливают в трубопровод после предколонки и после датчика давления. Фильтр предназначен для удаления микрочастиц, которые иначе могли бы попасть далее в систему. Сам по себе фильтр представляет собой корпус, в котором имеется пористая фритта. Чтобы обеспечить защиту аналитической колонки, размер пор фритты должен быть тем же или меньше, чем средний размер пор фритты в головной части аналитической колонки. Замена этой фритты должна быть предусмотрена графиком регламентных профилактических работ.

Насыщающая предколонка отчасти действует, как фильтр, однако сама же и становится источником микрочастиц, называемых «пылью». «Пыль» – это малые частицы силикагеля, оставшиеся в процессе производства. Хотя по большей части они удаляются при набивке и кондиционировании, какое-то количество может остаться (а новые частички могут появляться по мере старения материала предколонки). При использовании предколонки фильтр в линии трубопровода предохраняет инжектор и аналитическую колонку от попадания «пыли» из предколонки. Если предколонка не используются, фильтр в линии трубопровода удаляет микрочастицы, образующиеся в растворителе и насосе (микрочастицы буфера, микрофрагменты кольца плунжера и т.п.).

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПФ 1. **Неожиданное повышение давления в хроматографе**. Скачок давления может быть вызван действием любого из элементов хроматографа, расположенных по ходу потока за датчиком давления. Чтобы определить, какой из них стал причиной повышения давления, необходимо испытать каждый элемент системы отдельно.

УСТРАНЕНИЕ. Резкое повышение перепада давления обычно говорит о том, что в каком-то из элементов установки произошли изменения. Возможно, введена загрязнённая проба, в хроматограф попали несмешиваемые растворители (часто также с пробой) или нерастворимые вещества (из про-

бы, кольцевых уплотнений плунжера или из нового элюента, который не был уравновешен перед употреблением). Если имеет место резкое повышение перепада давления на хроматографе, самый эффективный способ определить, какой из элементов за это отвечает, – это отсоединить все элементы и возвращать их в установку по одному.

В первую очередь надо испытать предколонку и соединительный трубопровод. Если в рабочем режиме они устанавливаются перед датчиком давления, для целей испытаний, следует установить их временно после датчика. Затем нужно присоединять по очереди и испытывать инжектор, защитную колонку, аналитическую колонку, наконец, детектор. Если какой-то из этих элементов является причиной повышенного перепада давления, отремонтируйте или замените его.

Замена проходного фильтра должна быть предусмотрена графиком регламентных профилактических работ. Процесс этот прост и не требует большого количества времени. Корпус фильтра необходимо демонтировать и открыть, старую фритту заменить на новую. Фритты обычно делают из одного из трёх материалов: нержавеющей стали, титана и ПЭЭК. Фритта может быть полностью изготовлена из этого материала или помещена в пластмассовую обойму. Чтобы максимизировать фильтрующую способность фильтра в потоке, пористый материал фритты должен быть несколько больше по диаметру, чем полость в корпусе. Фритты без пластмассовых обойм не уступают по эксплуатационным характеристикам фриттам в обоймах, зато, как правило, дешевле.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПФ 2. **Подача меняется случайным образом**. Труднее всего поддаются диагностике характеристики насыщающей предколонки. Зачастую её устанавливают перед датчиком давления, так что измеряемое значение перепада давления в системе не меняется, даже если предколонка начинает портиться.

УСТРАНЕНИЕ. Насыщающую предколонку используют, чтобы защитить аналитическую колонку от агрессивных элюентов. Эти агрессивные элюенты растворяют частицы силикагеля в насыщающей предколонке и ослабляют его структуру. Образующаяся «пыль» забивает каналы прохождения растворителя в предколонке. Сопротивление потоку становится настолько большим, что поток через предколонку начинает меняться случайным образом. Даже если рабочий перепад давления повышается, аварийной остановки хроматографа не происходит, поскольку датчик давления стоит после предколонки. Так же разрушается с течением времени и требует замены набивка, отличная по природе от силикагеля.

Кроме того, предколонка действует, как фильтр, и, как всякий фильтр, может засоряться. Следовательно, если используется предколонка, жизненно важно регулярно и достаточно часто заменять набивку и фритты предколонки. Если предколонки используются регулярно, и при этом часто осуществляется переход с одного типа аналитической колонки на другой, важно также, чтобы и в насыщающей предколонке использовался всякий раз другой материал, соответствующий материалу аналитической колонки.

3.7. Подготовка и хранение проб и стандартов

Пробы, поступающие в лабораторию на ВЭЖХ-анализ, можно разделить на три большие категории: жидкие (растворы), твёрдые (смеси) и суспензии. Каждая матрица ставит перед хроматографистом свои непростые задачи. Крайне важной стадией анализа является преобразование пробы в форму, совместимую с параметрами прибора, поэтому пробоподготовка – важнейший фактор успеха любого анализа. Поскольку типов проб существует множество, методика пробоподготовки также может разниться весьма существенно. Чаще всего применяются следующие варианты.

1. Прямой ввод (т.е. без пробоподготовки).
2. Фильтрование (или центрифугирование).
3. Разбавление и ввод.
4. Твердофазное экстрагирование.
5. Жидкостно-жидкостное экстрагирование.
6. Экстрагирование в аппарате Сокслета.
7. Обмен в растворе.

Первые три приёма создают для аналитика идеальные условия. Здесь проба изменяется крайне незначительно, продолжительность пробоподготовки невелика, а вероятность потери определяемого вещества минимальна. Остальные методики сопряжены с гораздо большими трудозатратами и являются многоэтапными. А когда этапов пробоподготовки несколько, вероятность ошибки (например, порчи пробы или неверных действий оператора) выше.

Подготовка сложных проб зачастую предполагает сочетание указанных методик, например, жидкостно-жидкостное экстрагирование сопровождается обменом в растворе или за разбавлением следует фильтрование. Цель такого сочетания – в получении пробы в виде, совместимом с методом анализа. Но что значит «совместимый»? Чтобы успешно провести количественный анализ, матрица полностью подготовленной пробы должна отвечать трём критериям. Во-первых, она должна находиться в жидкости,

смешиваемой с подвижной фазой. Во-вторых, концентрация определяемых веществ должна попадать в линейный диапазон рабочей характеристики детектора. В-третьих, она должна быть устойчивой к растворителю пробы в продолжение всего времени пробоподготовки и анализа. Это время может составлять многие часы.

Пробоподготовка сопряжена с решением множества вопросов. В ряде случаев при разработке методики им не уделяют достаточного внимания, чаще всего полагая, что условия, отличные от тех, при которых методика разрабатывалась, не будут никем реализованы. Однако зачастую недооценка этих вопросов приводит к потере определяемых веществ. На устойчивость пробы в матрице по окончании подготовки в течение как короткого, так и продолжительного времени могут повлиять:

А. pH или характер буфера;
Б. Кислород;
В. Свет;
Г. Тепло,
Д. Органические вещества (примеси и продукты разложения).

Любой из этих факторов может привести к разложению определяемого вещества, что проявится в виде заниженных результатов количественного анализа и слишком большого значения стандартного отклонения. Во многих публикациях описано разложение анализируемых веществ при хранении, даже в устойчивых подвижных фазах. В некоторых случаях значительная часть аналита теряется буквально в считанные часы. Заметнее всего это проявляется при анализе с предшествующим получением производных. Практика показывает, что целесообразно организовать текущий контроль разложения как раствора, содержащего пробу, так и рабочего стандарта. Иными словами, все компоненты должны подвергаться испытаниям на устойчивость. Как правило, такие испытания входят как часть в процесс разработки и валидации методики.

Ещё важнее найти подходящие условия хранения дорогостоящих или труднодоступных эталонных веществ (стандартов). Здесь важна долговременная устойчивость стандарта. Должна быть доказана устойчивость анализируемых веществ при хранении в холодильнике, морозильнике, цикле замораживания и размораживания, иначе придётся готовить стандарт заново для каждого анализа.

Эту группу вопросов можно дополнить еще несколькими, возникающими при работе с пробами и не связанных с устойчивостью определяемых веществ:

1. Адсорбция аналитов в ёмкости для пробы, шприце, петле инжектора.
2. Потребность во внутреннем стандарте для оценки потерь на этапе предварительной обработки пробы.
3. Точность при разбавлении.
4. Тщательность перемешивания всех растворов.
5. Обеспечение однородности пробы при ее отборе.

Типовые методики работы и методики анализа, в которых изложены в явном виде все эти вопросы и порядок их решения, пишутся как раз для того, чтобы исключить возможные различия результатов от оператора к оператору и от лаборатории к лаборатории. Точное следование методикам совершенно необходимо для получения высококачественных и воспроизводимых результатов.

Неустойчивость анализируемых веществ и нарушение порядка обращения с пробами могут привести не только к потере аналитов. Многие из перечисленных переменных влияют и на отклик детектора: значение pH и природа буфера, наличие кислорода в элюенте, присутствие других органических веществ в пробе. К числу классических примеров относятся чрезвычайно сильная зависимость эффективности флуориметрического детектора от pH и состава растворителя (состава органических веществ и их концентрации в водных растворах). Даже при детектировании в УФ диапазоне коэффициент поглощения тоже зависит от состава элюента (хотя обычно и в меньшей степени, чем при использовании флуориметрических детекторов), в особенности для протонных растворов. Единственный путь устранения влияния этих факторов состоит в том, чтобы готовить пробу в растворителе, как можно более близком по составу к подвижной фазе. Если это невозможно по каким-либо причинам, следует готовить, по крайней мере, стандарты в том же растворителе, что и пробу.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПС 1. **Изменения концентрации эталонного раствора**. Если стандартный раствор с течением времени разлагается, будет казаться, что содержание определяемых веществ в пробах выше, т.к. пробы всякий раз готовят заново.

УСТРАНЕНИЕ. Один из наиболее распространённых сегодня подходов к количественному анализу в ВЭЖХ состоит в использовании внешних стандартов. Иными словами, количественное определение аналитов в пробе зависит от использования известного эталонного вещества или набора стандартов, которые вводятся в хроматограф отдельно от самой пробы. При этом весь процесс подготовки и ввода пробы и стандарта должен быть чрезвычайно подробно определён и воспроизводим.

Обычно кажущиеся изменения концентрации стандарта могут быть обусловлены неполным растворением пробы, неправильным переносом аликвотного количества с помощью пипетки, некорректным заключительным разбавлением и неполным перемешиванием. Эти вопросы рассматриваются подробно далее в ПС 3.

При использовании внешних стандартов хроматографисты склонны готовить их заранее и хранить длительно. В одних случаях это приемлемо, в других – нет. При валидации методики это – один из ключевых этапов её разработки: порядок приготовления *и хранения* стандарта, а также его точная допустимая продолжительность хранения – важнейшие параметры любой методики. В частности, следует отметить, что мерные стаканы и колбы не рассчитаны на длительное хранение стандартных растворов и непригодны для этого. Растворитель испаряется даже из стеклянного сосуда с притёртой пробкой, в результате объём и концентрация определяемого вещества изменяются. Следовательно, как только приготовление стандарта окончено, его нужно перенести в соответствующую, закрывающуюся герметически, ёмкость для хранения. Зачастую, чтобы длительно сохранить состав стандарта, его нужно держать в холодильнике или морозильнике.

Хотя охлаждение замедляет разложение стандартных веществ, оно вызывает другую проблему: устойчивость в цикле замораживания – размораживания. Чтобы ответить на этот вопрос, эталонные растворы зачастую разливают на множество малых порций и так хранят. При этом каждая порция замораживается и размораживается только раз, поэтому ухудшение свойств раствора при этом минимизируется. Помните, что замороженные пробы перед применением следует выдержать, пока температура не достигнет комнатной. Для этой цели лучше оставить их размораживаться на ночь или осторожно подогреть на водяной бане с тёплой водой. Когда проба достигла комнатной температуры, её следует тщательно перемешать, чтобы добиться однородности распределения анализируемых веществ.

Чтобы исключить ошибки, обусловленные неустойчивостью или разложением стандарта, целесообразно готовить свежий эталонный раствор непосредственно перед анализом. Это, разумеется, сопряжено с дополнительными финансовыми и трудозатратами, но сводит к минимуму возможность появления ошибок. К сожалению, стандарты иногда имеются лишь в ограниченных количествах, чрезвычайно дорого стоят или неустойчивы. Если по какой-либо из указанных причин приготовление эталонного раствора непосредственно перед анализом невозможно, тогда нужно организовать текущий контроль его качества по какому-то параметру, который не изменяется со временем и прямо связан с определяемым веществом.

В этом случае очень эффективным решением может оказаться использование внутреннего стандарта. Этот приём предполагает использование в качестве эталонного соединения, очень близкого по структуре к анализируемому веществу. Внутренний стандарт в известной концентрации вводится в пробу перед анализом. В результате детектор генерирует некий отклик (чаще всего определяемый, как отношение площадей пика на единицу концентрации определяемого вещества и внутреннего стандарта), по которому рассчитывают концентрацию анализируемого вещества. При этом любые незначительные изменения – в процессе пробоподготовки, в объёме пробы, вводимом в хроматограф, или в самом хроматографическом процессе – компенсируются соответствующим изменением площади (или высоты) пика внутреннего стандарта.

Следует отметить, что изменение площади пика само по себе ещё не является причиной искать неисправность в хроматографе. Скорее, всего, это один из показателей, помогающих выявить характер неисправности. Такое изменение важно, если при этом какой-то из параметров выпадает за рамки рабочего диапазона, определённого по протоколам опытов за длительное время. Текущий контроль параметров хроматографической системы относится к вопросам контроля пригодности, и поэтому рассматривается в разделе 3.12.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПС 2. **Результаты анализа отличаются от ожидаемых**. Чаще всего это происходит при анализе продуктов, состав которых соответствует хорошо определённым техническим условиям или указан на этикетке.

УСТРАНЕНИЕ. Отличие результатов полученных с помощью ВЭЖХ от заданных по ТУ (техническим условиям) может быть обусловлено множеством причин, но здесь мы рассмотрим только те, что связаны с пробоподготовкой. Причиной потерь определяемых веществ, о которой часто забывают, могут быть сосуды, в которых проба находится в процессе подготовки.

Рис. 3.26 иллюстрирует результат извлечения различных анализируемых веществ из жидкостей после промывания стеклянных сосудов и мерных колб. Если в процессе валидации методики всегда используют сосуды одних и тех же типов и ёмкостей, коэффициент извлечения не слишком различается. Если же тип или ёмкость применяемых сосудов другие, чем это описано в методике, это может оказать существенное влияние на коэффициент извлечения. Дело в том, что отношение площади к объёму тем больше, чем сосуд меньше. Следовательно, переход от использования мерной колбы на 100 мл к колбе на 25 мл может существенно сказаться на

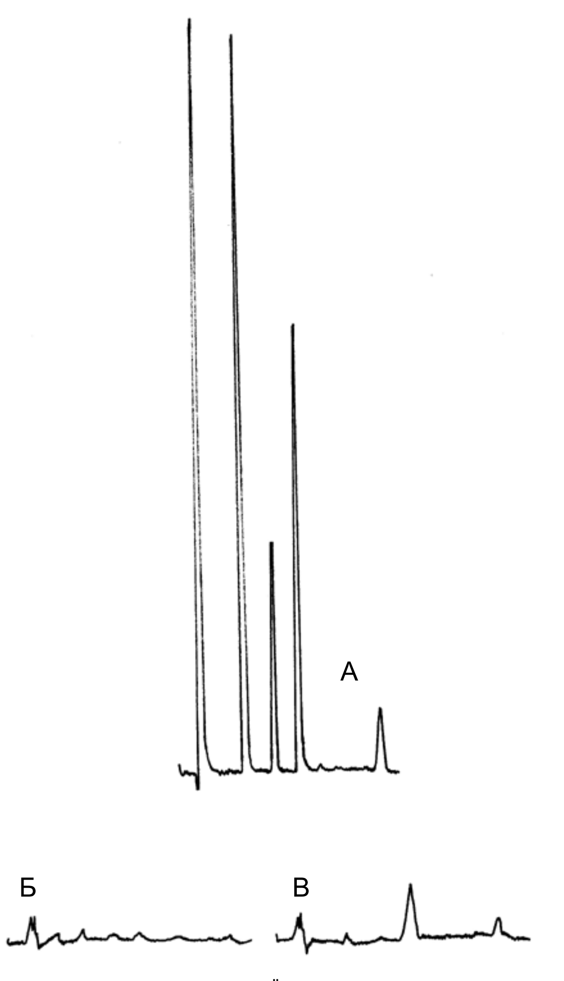


Рис. 3.26. (А) Хроматограмма стандарта четырёх полиароматических углеводородов: нафталина, фенантрена, антрацена и хризена. (Б) Хроматограмма жидкости, которой промыта ёмкость для хранения раствора стандарта после его ввода в хроматограф. (В) Хроматограмма последней порции ИПС, которым промыта мерная колба после ввода в хроматограф. Масштаб по оси отклика одинаков для всех трёх хроматограмм. Следует обратить внимание на то, что в колбе осталось заметное количество антрацена и хризена.

извлечении анализируемых веществ малой концентрации. Аналиты, содержащиеся в большой концентрации, также могут адсорбироваться стенками

сосудов, но в процентном отношении их потери будут пренебрежимо малыми.

Изменение материала или конструкции любого из сосудов для хранения пробы также может заметно сказаться на количественных результатах. Во многих методиках, прошедших межлабораторную или межцентровую валидацию, материал и конструкция этих сосудов указаны недвусмысленно. В ряде случаев этот материал представляет собой стекло, поскольку оно дёшево, всегда имеется в наличии, достаточно прочно, легко поддаётся очистке и допускает многократное применение. Особого внимания заслуживают случаи, когда анализируемые вещества неустойчивы к воздействию света, т.е. в процессе выполнения методики нужно применять стекло янтарного цвета.

Также могут использоваться пластиковые сосуды, в особенности в процессе отбора пробы. Поскольку видов пластмасс имеется множество, следует чётко определить, какую использовать. В противном случае перед систематическим использованием нужно оценить различия в адсорбции анализируемых веществ пластмассой и наличие в пластмассе экстрагируемых веществ.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПС 3. **Невоспроизводимые результаты**.

УСТРАНЕНИЕ. Случайные изменения результатов, если они обусловлены ошибками пробоподготовки, чаще всего можно отнести на счёт следующих явлений.

1. *Неоднородность проб*. Этот вопрос возникает ещё до отбора пробы. Например, однородность исходного материала зависит от его обработки до отбора пробы, количества отобранной пробы, приёма пробоотбора. Наиболее тяжёлый с точки зрения получения воспроизводимых результатов случай – когда проба содержит смесь твёрдых веществ. Наиболее непротиворечивые результаты анализа получаются при отборе проб тщательно перемешанных жидкостей.

Вопросы однородности важны также при приготовлении эталонных растворов. Если исходный стандарт последовательно разбавляют для построения калибровочной кривой, каждый разбавленный раствор следует тщательно перемешать перед отбором аликвотного количества и следующим разбавлением. После разбавления раствор также следует тщательно перемешать, прежде чем разбавлять дальше.

Следует обратить внимание на то, что скорость, в которой проба растворяется в растворителе, зависит от её природы и количества. В некоторых случаях на кинетику процесса растворения существенно влияет порядок добавления растворителей к пробе. Например, урацил в воде растворяется

быстро, а в ацетонитриле – очень медленно. Растворённый в воде урацил затем уже прекрасно растворяется в смесях воды с ацетонитрилом. Поэтому лучший способ перевести урацил в раствор – растворить его в воде, затем добавить нужное количество ацетонитрила.

В случаях, когда на заключительном этапе в пробе имеется смесь растворителей, выделяющаяся при смешении теплота может привести к значительным изменениям объёма. К примеру, смешение ацетонитрила с водой – процесс эндотермический (раствор при смешении охлаждается), сопряжённый с уменьшением в объёме (т.е. 50 мл ацетонитрила + 50 мл воды < 100 мл). Напротив, смешение метанола с водой – процесс экзотермический (раствор нагревается), соответственно, объём возрастает (т.е. 50 мл метанола + 50 мл воды > 100 мл).

Надлежащий порядок приготовления таких смесей таков. Отмерить точный объем одного из компонентов, перенести в мерную емкость, прибавить второй компонент, но не доводить жидкость до метки. Смесь перемешать, дать остыть или нагреться до комнатной температуры, и лишь затем довести объём смеси до метки. После этого, снова тщательно перемешать. По возможности, использовать растворы, состав которых как можно ближе к требуемому. Это позволит свести к минимуму нежелательные явления.

Если проба растворяется медленно, существенно ускорить этот процесс может ультразвуковая обработка. Следует помнить, однако, что хотя ультразвуковая обработка способствует переводу определяемых веществ в раствор, она *не обеспечивает* перемешивания раствора. Кроме того, вследствие ультразвуковой обработки раствор нагревается. При нагревании объём увеличивается. Следовательно, ультразвуковую обработку также нужно производить до окончательного доведения объёма раствора до метки. После того, как проба полностью растворилась, необходимо дать раствору остыть до комнатной температуры и тщательно перемешать.

2. *Цикл замораживания – размораживания*. Здесь также речь идёт об однородности, но уже не при пробоотборе. Чаще всего ошибки на этом этапе возникают при использовании автоматических устройств пробоподготовки. В этом случае пробы и стандарты помещают на лоток или в кассету. Во многих случаях стандарты до использования хранят в охлаждённом или замороженном состоянии. Поскольку хроматографист может отвлечься на разработку и документирование последовательности опытов, охлаждённый или замороженный стандарт может попасть прямо в лоток автосамплера. При медленном оттаивании в сосуде со стандартом образуется градиент концентрации. Если в это время проба стандарта попадёт в

хроматограф, будут получены рассогласованные результаты – постепенно уменьшающаяся площадь пика.

Необходимо убедиться, что все стандарты полностью разморожены и доведены до комнатной температуры, прежде чем их использовать. Процесс оттаивания ускоряется, если поместить флаконы в тёплую воду. После размораживания не нужно забывать тщательно перемешивать эталонные растворы.

3. *Попадание веществ из одной пробы в другую (кросс-контаминация)*. Для всех проб и стандартов необходимо *обязательно* использовать отдельные емкости для отбора проб и сосуды для подготовки и разбавления. Также *обязательно* использовать отдельные пипетки (для качественного или количественного переноса) для раствора каждого вида. Стеклянные сосуды после каждого использования должны быть тщательно очищены, чтобы не допустить попадания веществ предыдущей пробы в последующую.

В настоящее время в процессе подготовки проб часто применяются процессы фильтрования и твердофазной экстракции. Настоятельно рекомендуется использовать для каждой пробы отдельный фильтр (или колонку для ТФЭ). Необходимо помнить, что эти изделия предназначены для удаления из проб *ненужных, неопределяемых* составляющих, в частности, микрочастиц и побочных веществ. Поэтому вопрос о кросс-контаминации проб необходимо рассматривать в ключе не только попадании определяемых веществ из одной пробы в другую, но и загрязнении следующей пробы неопределяемыми составляющими из предыдущей.

4. *Неправильное разбавление*. При количественном переносе с помощью пипетки необходимо дать достаточно времени, чтобы весь объём вещества из неё вытек. Кроме того, на заключительной стадии разбавления, прежде чем окончательно довести объем раствора до метки, следует удостовериться в том, что его объём лишь незначительно отличается от полного, при этом раствор тщательно перемешан и доведён до комнатной температуры. При окончательном доведении до нужного объёма должно добавляться небольшое количество раствора (не более 2 % от общего объёма), чтобы исключить дальнейшее изменение объёма смеси вследствие изменения температуры при смешении.

Необходимо помнить, что автоматические пипетки с пластмассовыми носиками предназначены исключительно для водных растворов. Поскольку проба втягивается за счёт разрежения, такие пипетки калиброваны под растворы, вязкость и коэффициент поверхностного натяжения которых близки к вязкости и коэффициенту поверхностного натяжения воды. Раст-

воры в органических растворителях или водные растворы, содержащие значительную долю органического растворителя, несовместимы с такими пипетками в терминах обеспечения единообразия и воспроизводимости переносимых объёмов.

Если перенос с помощью пипетки желателен, можно использовать специальные пипетки, в которых поршни имеют фторопластовое покрытие и перемещаются вверх-вниз на всю длину калиброванного стеклянного цилиндра. Такие пипетки совместимы с большинством смесей растворителей.

5. *Несовпадение окончательного объёма пробы с начальным.* Ошибки этого типа возникают чаще всего, когда пробу протягивают разрежением через фильтр или колонку (например, для ТФЭ). Окончательный объём пробы считается равным исходному перед фильтрованием или разделением на колонке. К сожалению, в тех случаях когда используют летучие органические растворители, под действием разрежения может иметь место заметное уменьшение объема. В особенности это касается коллекторов для ТФЭ, в которых можно обрабатывать одновременно 12 и даже более проб. Здесь первая проба находится под разрежением всё время, нужное для обработки проб со второй по двенадцатую.

В подобных случаях, чтобы получить окончательный объём, действительно равный требуемому, нужно собирать вещество на выходе в мерную колбу. После того, как все пробы обработаны, каждую из них до ввода в хроматограф доводят до объёма и тщательно перемешивают.

При проведении ТФЭ появление несогласованных результатов может быть обусловлено ещё двумя причинами. Во-первых, для проб, в которых анализируемые вещества выходят из колонки, а примеси удерживаются, необходимо пропустить через колонку достаточное количество пробы, чтобы колонка полностью уравновесилась с определяемыми веществами, и их концентрация на выходе колонки совпадала с концентрацией в исходной пробе. Если через колонку пропущено слишком малый объем пробы, будут получены заниженные результаты анализа. Если примеси выходят из колонки по времени до определяемых веществ, нужно использовать достаточное количество растворителя, чтобы вымыть определяемые вещества полностью.

Независимо от варианта реализации ТФЭ, если это возможно и практически осуществимо, следует вводить в пробу стандартное вещество для определения коэффициента извлечения и обрабатывать его совместно с пробой. В этом качестве может быть использовано вещество, сходное химически с определяемым. Высокая степень извлечения стандартного вещества – показатель того, что процесс ТФЭ прошёл успешно.

6. *Влияние вязкости пробы*. Обработка пробы тем сложнее, чем выше ее вязкость (не говоря уже о возможном её загустевании). В особенности это утверждение справедливо, если процесс пробоподготовки предполагает фильтрование или фракционирование на колонке. Рис. 3.27 иллюстрирует результаты анализа арахисового масла на содержание афлатоксинов в случае использования необработанной пробы и пробы, предварительно разбавленной гексаном.

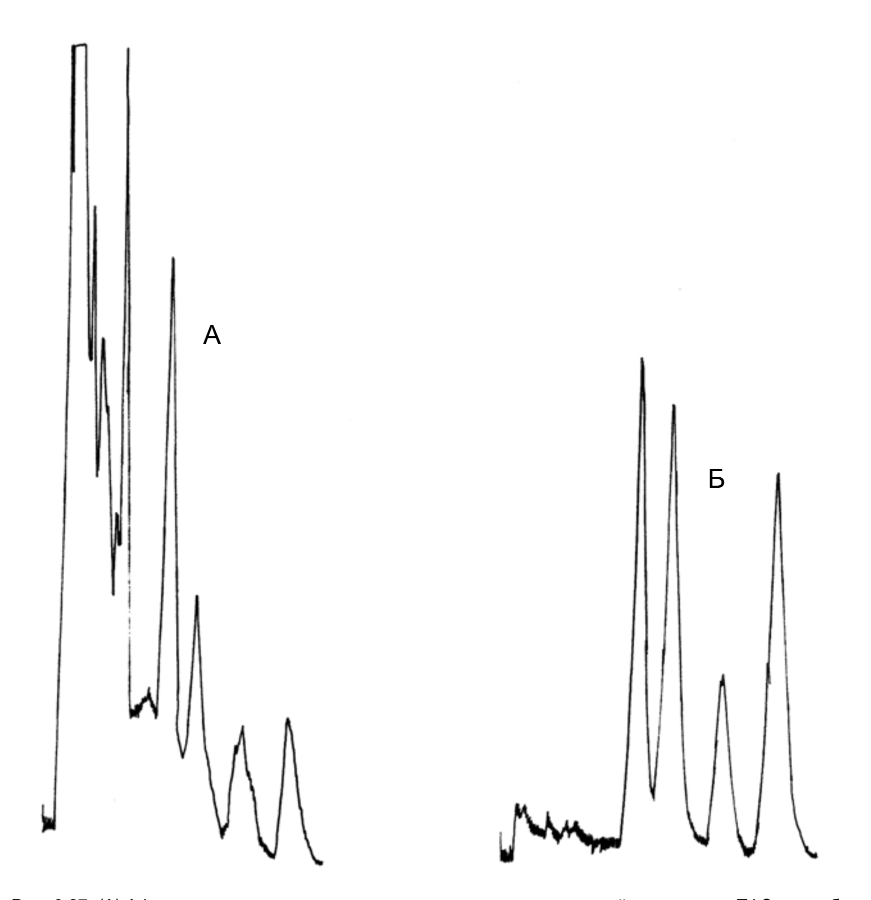


Рис. 3.27. (А) Афлатоксины в арахисовом масле на выходе силикагелевой колонки для ТФЭ; неразбавленная проба. Следует обратить внимание на большую высоту пиков с малыми временами удерживания. (Б) Та же проба, разбавленная гексаном 2:1, пропущенная через силикагелевую колонку для ТФЭ и проанализированная. Необходимо отметить исчезновение пиков с малыми временами удерживания и увеличение выхода афлатоксинов.

Если вещество пробы не обладает достаточной текучестью, массоперенос аналитов из вязкой жидкости на поверхность и обратно резко замедляется. Соответственно, даже очень небольшие изменения скорости обработки пробы будут сильно сказываться на порядке элюирования определяемых веществ и общих результатах количественного определения. Разбавление таких проб менее вязким растворителем повышает эффективность массообмена и улучшает воспроизводимость результатов.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ ПС 4. **Непредвиденные пики на хроматограмме**. Размеры и времена выхода таких аномальных пиков могут быть неизменными, что говорит о единственном источнике загрязнения, либо переменными, когда источников загрязнения или изменяющихся параметров несколько.

УСТРАНЕНИЕ. Здесь в качестве источника аномальных пиков мы рассмотрим только пробоподготовку. Остальные причины рассмотрены в разделах 3.1 и других разделах данной главы.

Вообще избежать ошибок, связанных с загрязнением при пробоподготовке, сложно, поскольку почти каждая операция может стать источником загрязнений. К наиболее распространённым относятся следующие источники загрязнения:

1. Загрязнённая стеклянная химическая посуда (мерные колбы, ёмкости, пипетки).
2. Пластмассовые ёмкости.
3. Растворители и добавки к растворителям.
4. Вспомогательные расходные материалы, например, колонки для ТФЭ и вкладыши фильтров.
5. Сами пробы.
6. Колонки и прочие элементы хроматографической системы.

Рассмотрим их по отдельности.

Загрязнённая стеклянная химическая посуда. Стеклянную химическую посуду часто моют и используют многократно. Соответственно, не исключен перенос вещества пробы из предыдущего анализа в последующий. Признаком загрязнения посуды является выход аномальных пиков только в одной пробе (или небольшой части проб). Если была загрязнена колба, использованная для приготовления серии рабочих стандартов, пики обусловленные примесями будут иметься в каждом эталонном растворе и разбавляться в соответствующих пропорциях. Для проведения особо важных анализов целесообразно промаркировать полный набор посуды и использовать его исключительно для приготовления соответствующих проб.

В подавляющем большинстве случаев достаточно тщательно промыть стеклянную посуду вручную с помощью сильного моющего средства, а затем многократно промыть водой. На рынке имеются моющие средства, специально предназначенные для удаления остатков неорганических и органических веществ, а также веществ, содержащих белок. Важно выбрать моющее средство, совместимое и эффективно удаляющее остатки пробы. Ещё более эффективны лабораторные посудомоечные машины. Однако если определяемые вещества отличаются сильной адгезией к стеклу, такого промывания может оказаться недостаточно. В этих случаях загрязнение пробы из-за недостаточно чистой стеклянной посуды можно исключить, если использовать для очистки более активные вещества, к примеру, 50 %-ный водный раствор азотной кислоты, 5 %-ный раствор KOH в спирте и раствор «Chromerge®». При приготовлении, хранении и утилизации этих веществ, а также при работе с ними следует соблюдать особую осторожность.

Изменения проб в ёмкостях для хранения. Стекло – наиболее распространённый материал ёмкостей для хранения и переноса проб. Изменчивость этого материала обычно проявляется не в самом материале или конструкции, а в допусках при производстве (классе) изделия. Например, пипетки и мерные колбы выпускаются в классах A и B, причём класс A имеет более высокую точность. Пипетки также выпускаются в классах «для хранения» (TC) и «для переноса» (TD). Необходимо убедиться в том, что систематически используются пипетки надлежащего класса (чаще всего TD).

В лабораториях также часто используются полиэтиленовые ёмкости. К сожалению, у различных производителей полиэтилен существенно различается по типу и количеству используемых пластификаторов, соответственно, по чистоте готового изделия; различаются классы «промышленный», «медицинский» и «лабораторный». Пластификаторы выделяются из материала ёмкости обычно в крайне малых количествах и могут существенно сказаться на результатах анализа только следовых и ультраследовых количеств. Аномальные пики чаще всего появляются, если начинают использовать пластмассовые ёмкости другого производителя или, реже, после получения новой партии ёмкостей. Поскольку пластмассовые ёмкости и крышки к ним обычно получают в отдельных упаковках, перед использованием настоятельно рекомендуется произвести их очистку.

Переход на новую партию растворителя, сорбента для ТФЭ или фильтра. Влияние загрязнений из растворителей было изложено ранее (PC4 и PC5). Единственное дополнительное соображение по поводу растворителей для пробоподготовки появляется при их использовании в жидкостно-жидкостном экстрагировании или замене растворителя. В данном случае растворитель и имеющиеся в нём примеси концентрируются вместе с пробой в 10 – 1000 раз.

Соответственно, следует всегда готовить и анализировать фоновую пробу растворителя (т.е. выполнять холостой опыт с полным циклом пробоподготовки). Такие холостые опыты с растворителем весьма важны, особенно если появляется аномальные пики, поскольку позволяют вычесть эти пики из хроматограммы пробы (или хотя бы объяснить, откуда они берутся).

Твердофазная экстракция (ТФЭ) широко применяется сегодня в поточных анализах в процессах очистки и концентрирования пробы. Колонки для ТФЭ являются главным источником аномальных пиков ВЭЖХ. Отчасти это обусловлено тем, что колонки «общего назначения» состоят из трёх основных компонентов: полипропиленового корпуса, полиэтиленовых фритт и набивки (рис. 3.28). Как уже говорилось, пластмассы могут сами по себе быть источником ошибок из-за выделяющихся из них веществ. Ещё одним источником загрязнения может быть набивка колонки для ТФЭ, поскольку она имеет большую площадь поверхности. В процессе изготовления на этой поверхности могут оставаться химически связанные примеси. Кроме того, в упаковке находятся несколько колонок, а не одна, причём в открытом, а не герметизированном виде. Как только упаковка снята, набивка может начать адсорбировать загрязнители из воздуха.

Чтобы удалить загрязнения из колонки для ТФЭ, её промывают некоторым количеством растворителя с сильными элюирующими свойствами (например, ацетонитрила или метанола для обращённо-фазных сорбентов, гексана, дихлорметана или изооктана для нормально-фазных сорбентов) прежде, чем приступить к обработке проб. Это позволяет не только удалить примеси с

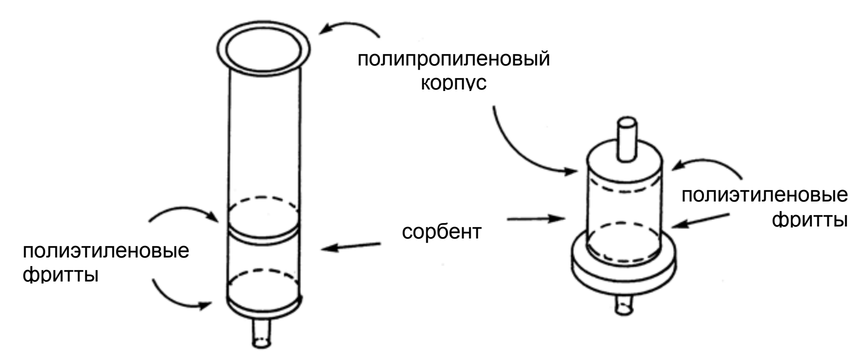


Рис. 3.28. Колонка (А) и патрон (Б) для твердофазной экстракции в разрезе. В конструкции использованы те же материалы, но различия самой конструкции предполагают разные показатели назначения: колонка используется с многопортовым трубопроводом, а патрон – для единичных проб в сочетании со шприцом с луэровским соединителем.

поверхности, но и уменьшить до минимума количество веществ, которые могут быть экстрагированы с поверхностей полипропиленового корпуса и полиэтиленовых фритт. Эмпирическим путём установлено, что такая очистка обычно требует от 3 до 5 мл промывного раствора на грамм набивки.

Если при пробоподготовке производится фильтрование, следует убедиться, что материалы как фильтра, так и корпуса (или крепления) совместимы с используемой системой растворителей. Необходимо обратить внимание на то, что у разных производителей могут использоваться разные материалы корпусов, даже при одном и том же, совместимом, материале фильтра. Например, такие агрессивные растворители, как ТГФ или пиридин, чрезвычайно сильно извлекают из пластмасс компоненты красителей. В результате на один материал корпуса фильтра растворитель может не подействовать, а из другого извлечь значительное количество веществ. Необходимо обязательно испытать каждый элемент фильтра на совместимость прежде, чем начать применять его в методике вместо ранее использовавшегося.

Загрязнение пробы. Одним из наиболее трудноустранимых источников ошибок является переход от одного типа пробы к другому. Загрязнение пробы может иметь место на любом этапе производства, при отборе пробы, а также в процессе пробоподготовки. Зачастую единственный способ выявления источника загрязнения состоит в анализе свежей пробы.

Загрязнители, содержащиеся в пробе, могут сказаться на функционировании хроматографа ВЭЖХ двояко. Во-первых, на них может отреагировать детектор. В худшем случае время их удерживания совпадёт с временем удерживания определяемых веществ. Во-вторых, детектор может и не реагировать на загрязнители, но они могут осаждаться на входе или на фриттах колонки. При этом не исключено нарушение работы колонки, проявляющееся в размывании пика, двоении или расщеплении пиков. Дело в том, что такое осаждение приводит к появлению вторичного механизма удерживания. Это проявляется всё сильнее по мере ввода новых проб. Осаждение в начале колонки может также привести к забиванию входной фритты, пор материала набивки, наконец, межзёренных каналов. В результате перепад давления постепенно растёт, и, в конечном счёте, система выходит из строя, и требуется замена колонки. Если известно, что такого рода примеси присутствуют в пробах, а удалить их до начала анализа не представляется возможным, весьма желательно установить защитную предколонку.

Колонки и другие элементы системы ВЭЖХ. Чаще всего ошибки возникают при использовании элементов, ранее бывших в употреблении. К сожалению, слишком часто элементы, демонтированные из хроматографа, не маркируют, а просто складывают в ящик стола или коробку. При этом, при исполь-

зовании более сильного элюента могут появиться случайные пики, если элементы системы не очистили перед этим надлежащим образом. Особенно страдают этим колонки, поскольку материал набивки имеет большую площадь поверхности, однако тот же эффект может проявиться и по причине загрязнений осаждающихся в трубопроводах и в элементах инжектора.

Чтобы свести к минимуму вероятность подобных ошибок, необходимо использовать колонки для однотипного анализа (соответственно их промаркировав) или регистрировать использование колонок в журнале. В любом случае, перед работой необходимо тщательно промыть колонку растворителем с сильными элюирующими свойствами. Простой совет: после снятия капиллярных трубопроводов с хроматографа для ВЭЖХ *не устанавливайте их повторно*. Стоимость этих капилляров несоизмеримо меньше, чем затраты из-за простоя хроматографа и на работы по устранению неисправности.

3.8. Инжекторы

В настоящее время в ВЭЖХ используются инжекторы (устройства ввода пробы) в основном двух типов: ручные и автоматические. В обоих случаях назначение инжектора состоит в том, чтобы отбирать точный объём пробы и воспроизводимым образом подавать его в поток в системе ВЭЖХ.

Ручной инжектор состоит из четырёх основных частей: шприц, игла или порт инжектора, корпус инжектора и петля-дозатор (конструкция ручного инжектора приведена на рис. 3.29). С помощью шприца проба переносится

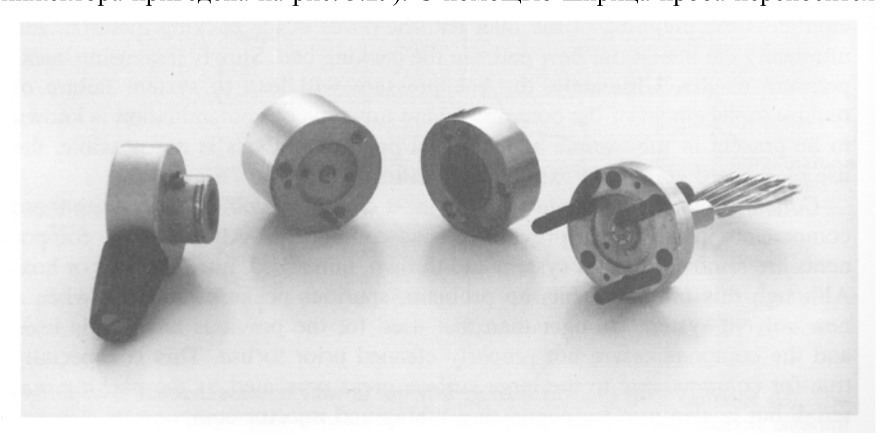


Рис. 3.29. Ручной детектор для ВЭЖХ в разобранном виде. Слева направо: рычаг «загрузка-ввод»; порт и корпус иглы; лицевая поверхность и кольцо статора; статор и петля-дозатор.

в петлю через порт инжектора. Проба находится в петле до ввода в хроматограф.

3.8.А. Шприцы

Шприц состоит из трёх частей: корпуса, поршня и иглы (рис. 3.30). Корпус обычно выполнен из стекла и оканчивается иглой. Как правило, корпус имеет градуировку по объёму, используемую при вводе в хроматограф части объёма петли-дозатора. Иглы шприцев изготовлены чаще всего из нержавеющей стали и крепятся к шприцу либо неразъёмно, либо на резьбе через переходник на конце корпуса. Сечение кончика иглы имеет квадратную форму, благодаря чему между шприцем и инжектором на конце порта инжектора образуется герметическое соединение.

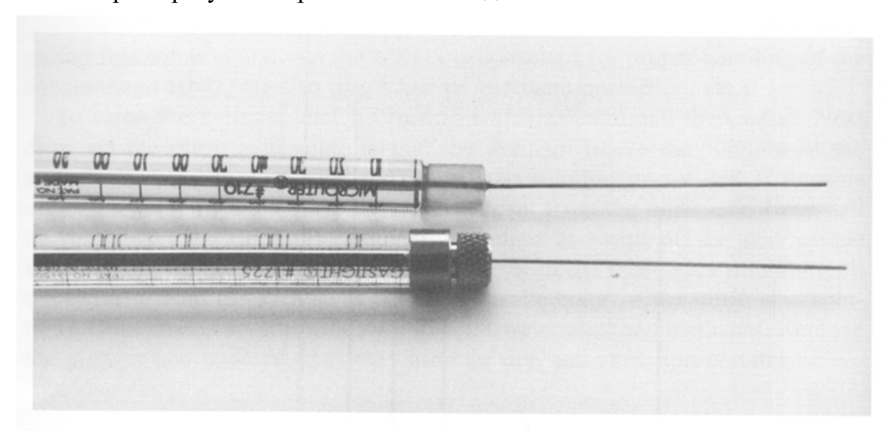


Рис. 3.30. Шприцы. Вверху: несъёмная игла, поршень из нержавеющей стали. Внизу: съёмная игла, поршень с фторопластовым наконечником.

Шприцы со скошенным кончиком, используемые в газовой хроматографии (ГХ), в большинстве случаев несовместимы с инжекторами для ЖЭ. Длина и внутренний диаметр иглы зависят от изготовителя инжектора.

Поршень шприца входит в его корпус плотно. При перемещении поршня вверх-вниз в корпусе проба втягивается в шприц или выталкивается из него. Обычно поршни изготовлены из нержавеющей стали или композитного материала с наконечником из ПТФЭ. Если шприц работает правильно, проба втягивается в объём между кончиком иглы и поршнем и удерживается там. В градуировке шприца учтён объём иглы.

Один из источников ошибок при вводе пробы – попадание веществ из предыдущей пробы в последующую. Это может происходить, если шприц не промыт перед вводом пробы. Кроме того, может иметь место старение шприца. Если соединение поршня с корпусом изношено, раствор может проникать за поршень. При перемещении поршня вверх остаток раствора из предыдущей пробы смешивается с новой пробой и попадает в хроматограф. Именно таким образом вещества из предыдущей пробы попадают в следующую. Поэтому между вводами проб шприц следует тщательно промывать.

Ещё один источник попадания в пробу сторонних веществ – загрязнение шприца. Зачастую можно заметить коричневый налёт в верхней или нижней частях шприца. Он появляется при длительной эксплуатации шприца, недостаточно тщательной очистке, неправильном хранении. Если не предполагается дальнейшее использование шприца в скором времени, следует тщательно промыть корпус совместимым растворителем, имеющим сильные элюирующие свойства, класса «чистый для ВЭЖХ», например, в случае обращённо-фазной хроматографии – метанолом. Затем вынуть поршень из корпуса, чтобы чистый растворитель испарился. Далее следует хранить шприц и корпус совместно. Смысл совместного хранения поршня и корпуса в том, что оба эти элемента подвержены износу. Следовательно, новый поршень от другого шприца не подходит к корпусу, бывшему в интенсивной эксплуатации.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ И 1. **Пики неанализируемых веществ уменьшаются по мере ввода последовательных проб**. Классический случай попадания веществ из предыдущих проб в последующие показан на рис. 3.31.

Даже если шприц, загрязненный твердыми веществами промывают перед работой, этого может оказаться недостаточно, чтобы быстро удалить осажденные вещества. Более того, если корпус и поршень изношены из-за длительной эксплуатации, вещества пробы могут просачиваться за поршень. В этом случае полностью промыть шприц оказывается затруднительно.

УСТРАНЕНИЕ. Периодически требуется более тщательная очистка шприца, чем просто промывание метанолом. О необходимости полной очистки шприца говорит, например, появление коричневого налёта в верхней или нижней частях корпуса. В подобных случаях очень эффективно промывание 50 %-ным водным раствором азотной кислоты (при приготовлении раствора необходимо соблюдать особую осторожность). Порядок работы с концентрированной азотной кислотой следует согласовать с санитарно-ги-

гиенической службой. При работе с кислотой обязательно пользоваться средствами индивидуальной защиты – перчатками и пр.

Очистку шприца необходимо выполнять следующим образом. Вначале

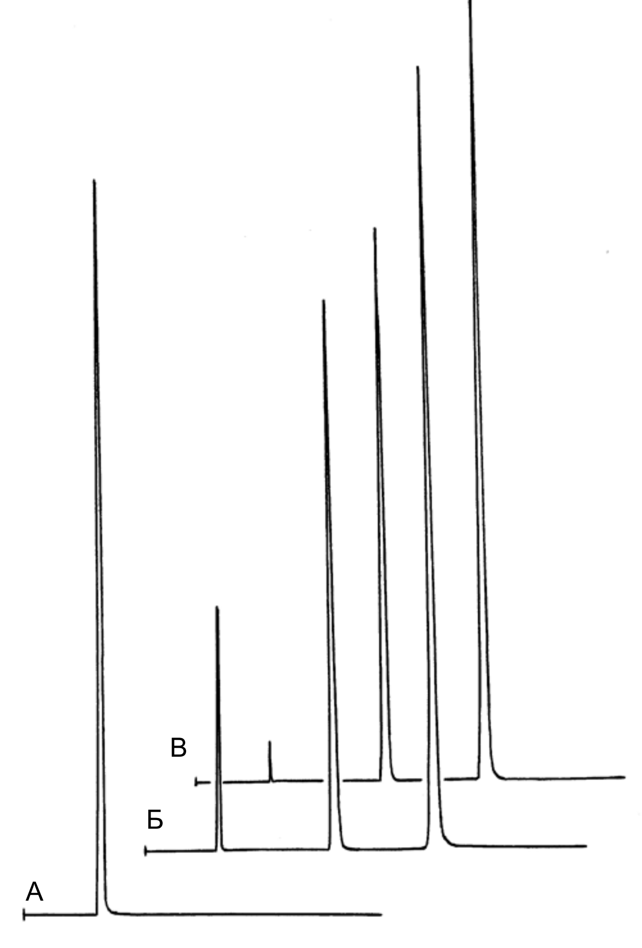


Рис. 3.31. (А) Хроматограмма первого ввода пробы метилпарабена. (Б) Хроматограмма следующей пробы, в которой пик метилпарабена отсутствует, однако имеются два пика веществ, сходных по строению с метилпарабеном. В этом случае пик метилпарабена обусловлен попаданием из шприца из предыдущей пробы. (В) В последующей пробе снова имеет место попадание небольшого количества метилпарабена. Аналогичным образом процесс протекает в автоматических инжекторах, не промываемых надлежащим образом.

промыть его метанолом, затем водой. Набрать в шприц раствор азотной кислоты. Оставить раствор в шприце на 10-15 секунд, после чего слить его в воду. Если внутри шприца имеется органический налёт, раствор азотной кислоты, вытекающий из шприца, будет окрашен в желтовато-коричневый цвет. Осторожно вытянуть поршень и удалить остатки кислоты бумажной салфеткой. Повторить промывание раствором азотной кислоты, пока раствор, вытекающий из шприца, не станет бесцветным (или не будет иметь цвет исходного раствора азотной кислоты). После этого следует промыть шприц водой, затем метанолом. Затем вытянуть поршень и протереть досуха. Корпусу дать высохнуть на воздухе. После чего обеспечить надлежащее хранение шприца.

3.8.Б. Ручные инжекторы

Шприц вставляют в порт иглы инжектора до упора (рис. 3.32). Порт содержит пластмассовую направляющую для иглы, благодаря которой шприц ориентируется так, что отверстие в игле устанавливается соосно с входным отверстием в корпусе инжектора. Кроме того, направляющая играет роль уплотнителя, предотвращающего просачивание пробы за пределы порта по

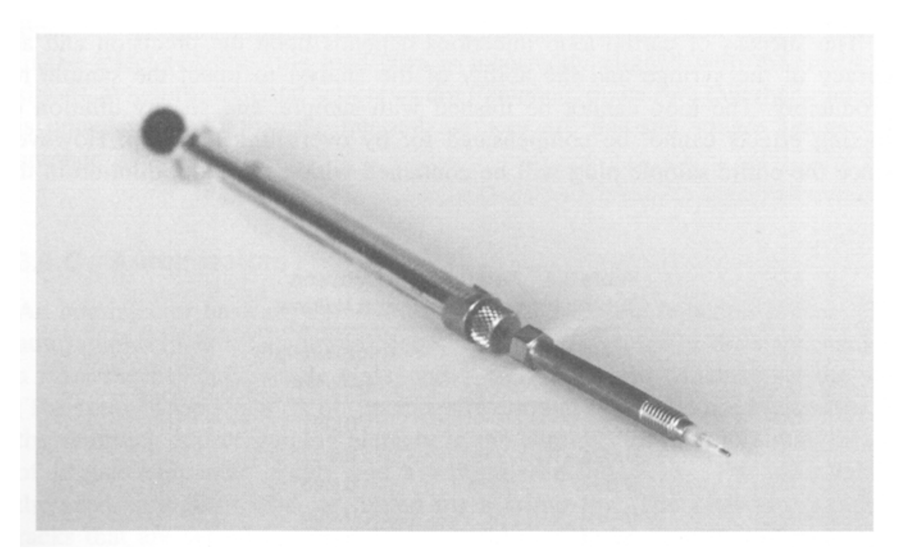


Рис. 3.32. Расположение иглы в порту. Уплотнение образуется по кромке порта (порт иглы извлечён из инжектора, чтобы было видно взаимное расположение шприца и порта).

периферии шприца. Со временем направляющая изнашивается, периодически её нужно заменять. Если замечено просачивание жидкости через порт иглы, значит, либо игла введена не до упора, либо направляющая износилась и её пора менять.

Процесс ввода пробы состоит в том, что петля-дозатор заполняется пробой, после чего рычаг инжектора из положения «заполнение» или «загрузка» переводят в положение «ввод» или «подача».

При этом поток подвижной фазы перенаправляется из обходного канала в канал, содержащий петлю-дозатор. Перед вводом пробы в инжектор подвижная фаза проходит мимо петли-дозатора (инжектор в положении «загрузка»). Пробу подают из шприца через порт иглы в петлю-дозатор. Необходимо обратить внимание на то, что попытка ввести пробу, когда петля-дозатор находится в потоке подвижной фазы, приводит к её вымыванию из инжектора через порт сброса и потере.

Петля-дозатор изготовлена из трубки известных внутреннего диаметра и длины. Сочетание этих размеров определяет номинальный объём петли. В таблице 3.4 показано соотношение внутреннего диаметра трубки и объёма на сантиметр длины. Избыток жидкости вытекает через трубопровод сброса в соответствующую ёмкость. Когда рычаг инжектор переводят из положения «загрузка» в положение «ввод», внутренний ротор поворачивается по отношению к статору так, что петля-дозатор попадает в канал между насосом и колонкой. Ввод нужно выполнять быстро, поскольку на время, пока рычаг находится между положениями «загрузка» и «ввод», поток прерывается.

В ручном инжекторе ввод пробы может осуществляться двояко: с *полным* или *частичным заполнением* петли-дозатора. При вводе с полным заполнением петли точность выше. В этом случае объём шприца, с помощью которого пробу вводят в петлю-дозатор, заведомо больше, чем номинальный объём петли. Чтобы избежать разбавления, через петлю обычно прогоняют при заполнении два-три её объёма (поскольку после предыдущего ввода петля осталась заполненной подвижной фазой). Строго говоря, при пятикратной промывке петли объёмом пробы, превышающим объём петли, раствор в петле будет разбавлен гораздо меньше, чем на 1 %. Это также позволяет исключить попадание веществ из предыдущих проб в последующие.

Таблица 3.4

Соотношение внутреннего диаметра и объёма трубки

Внутренний диаметр	Объём на единицу длины, мкл/см
0,102 мм (0,004 дюйма)	0,082
0,127 мм (0,005 дюйма)	0,127
0,178 мм (0,007 дюйма)	0,248
0,254 мм (0,010 дюйма)	0,506
0,508 мм (0,020 дюйма)	2,027
0,762 мм (0,030 дюйма)	4,560
1,016 мм (0,040 дюйма)	8,107

Успешное осуществление ввода с частичным заполнением петли-дозатора зависит от точности шприца и умения оператора вводить пробу воспроизводимым образом. Петлю в этом случае не удаётся промыть пробой, поэтому влияние разбавления и смешения не устраняется за счёт промывки петли. Однако, поскольку после введения проба полностью содержится внутри объёма петли-дозатора, разбавление в петле не приводит к ошибкам. Так же, как при вводе с полным заполнением, следует два-три раза промывать шприц очередной пробой, чтобы свести к минимуму влияние веществ из предыдущих проб. Необходимо помнить, что даже небольшая течь вокруг шприца или направляющей иглы или недостаточная воспроизводимость заполнения шприца до одного и того же уровня приводят к значительным ошибкам при вводе пробы с частичным заполнением петли.

Со временем петля-дозатор, вполне естественно, загрязняется. Очистка петли выполняется примерно так же, как и шприца. В этом случае петлю заполняют очищающим раствором с помощью шприца и соответствующего переходника. При этом рекомендуется петлю-дозатор перед очисткой демонтировать из инжектора, чтобы на его внутренние элементы не воздействовал очищающий раствор. Поскольку стоимость петли-дозатора составляет лишь малую часть стоимости инжектора, зачастую лучше просто периодически заменять её на новую.

Петли-дозаторы инжекторов изготавливают из различных материалов. Наиболее распространены петли, изготовленные из нержавеющей стали. Если вещества пробы чувствительны к воздействию металла (например, при ионной хроматографии или анализе белков), используют петли из ПЭЭК, а если важна совместимость с биологическими веществами – из титана. В любом случае периодическая очистка петли является очень важной процедурой.

Ввод пробы предполагает переключение потока с обходного канала на канал, содержащий петлю-дозатор. Как уже говорилось, для этого переводят рычаг дозатора из положения «загрузка» в положение «ввод». Ротор поворачивается, и поток перенаправляется в канал, проходящий через петлю. После нескольких тысяч вводов пробы ротор или уплотнение ротора могут износиться. Они требуют замены с периодичностью, указываемой в паспорте изготовителем инжектора. Если наблюдается течь во внутренних частях инжектора, его нужно разобрать и заменить узел ротора. При этом необходимо обращать особое внимание на взаимное расположение внутренних элементов инжектора, поскольку, если собрать инжектор, ошибочно повернув ротор на 90° (т.е. расположив отверстие для загрузки неверно, в положении «ввод»), в положении «ввод» потока не будет, зато он будет в положении «загрузка». При сборке необходимо тщательно следить затем, чтобы винты затягивались равномерно, чтобы поверхности внутренних элементов не перекашивались и точно прилегали друг к другу.

3.8.В. Автоматические инжекторы

Автоматические инжекторы, или автоинжекторы, позволяют вводить пробы в хроматограф без участия оператора. Автоматический инжектор

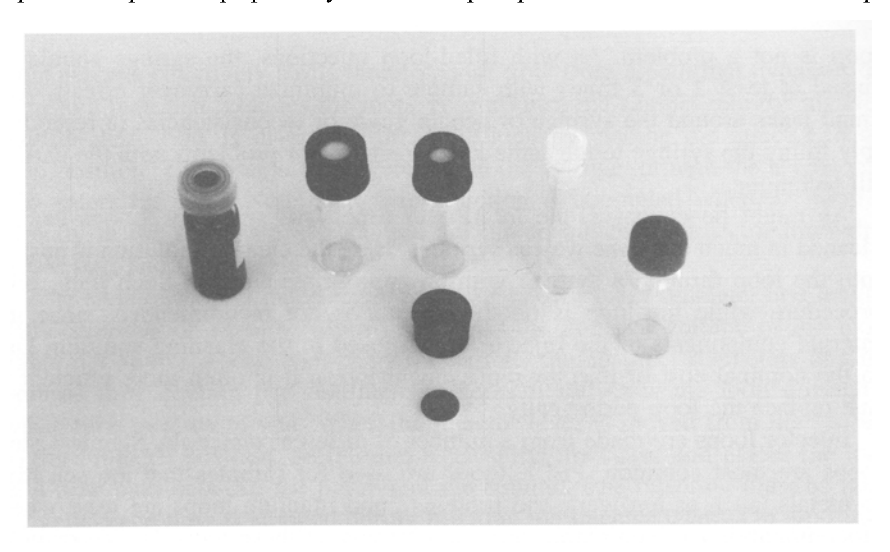


Рис. 3.33. Флаконы автоинжекторов. Следует обратить внимание на использование разного сорта стекол (янтарного цвета и прозрачного), колпачков различной формы (навинчиваемых и обжимных), а также разных диаметров отверстий в колпачках.

состоит из «петли-дозатора» пробы, управляемого шприца с иглой или подающего механизма, промывочного механизма, флаконов для проб и лотка или кассеты, куда эти флаконы вставляются (термин «петля» в данном случае не вполне корректен с технической точки зрения; мы будем использовать его для обозначения элемента, в котором содержится проба в автоинжекторе). Флаконы для проб состоят из стеклянного сосуда, колпачка и мембраны (рис. 3.33). Горловина флакона может быть на резьбе, прямой или с манжетой для обжимных колпачков. Флаконы располагают в лотках по прямоугольной сетке или по кругу (рис. 3.34). Конструкция механизма автоинжектора может быть различной, но в любом случае она обеспечивает перемещение флакона непосредственно под иглу пробоотборника.

Процесс ввода пробы повторяется циклически. Прежде всего, игла промывается заданным объёмом промывочного растворителя. Объём растворителя должен быть больше, чем суммарный объём иглы и петли-дозатора. Далее, флакон переносится с лотка под иглу пробоотборника. Игла прокалывает мембрану и движется вниз, ко дну флакона. Обычно в крайнем положении игла отстоит от дна флакона на 1-2 мм. Если объём пробы мал, используют специальные вкладыши для флаконов. Проба отбирается втягиваясь в петлю-дозатор через иглу. На этом этапе осуществляется заданное количество промывок пробой. Когда сделана последняя промывка иглы пробой, игла извлекается из флакона. Затем осуществляется ввод пробы. Пока элюируется проба, автоинжектор осуществляет промывку иглы, готовясь к следующему вводу пробы.

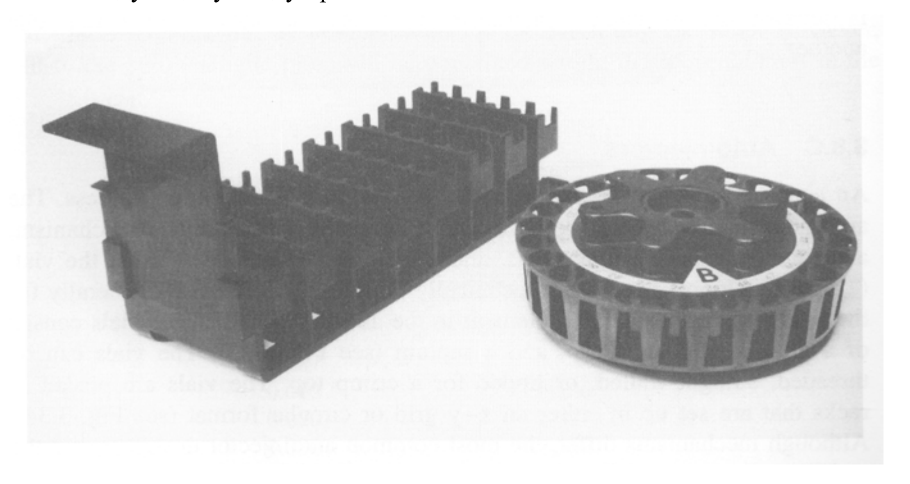


Рис. 3.34. Лотки автоинжекторов. Справа – прямоугольный, слева – круговой (карусельный).

Поскольку конструкция автоинжектора значительно сложнее, чем ручного, необходимо разработать план его регламентных профилактических работ. Обычно фирма-изготовитель указывает, какие из шприцев и прокладок нуждаются в очистке или замене.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ И 2. **Невоспроизводимые результаты, проявляющиеся в большом значении стандартного отклонения площадей пиков, коэффициентов отклика и т.д**. Работа автоинжектора обусловливает те же ошибки, что ручного. Но здесь появляются дополнительные источники ошибок, которые нужно иметь в виду.

УСТРАНЕНИЕ.

1. Важно, какой растворитель используется в качестве промывочного, хотя это зачастую не считают существенным для ввода пробы. Зачастую для промывки автоинжектора между вводами проб используют сильный растворитель. Он должен быть смешиваемым с растворителем для пробы. В некоторых случаях, когда для растворения пробы используют подвижную фазу, в ёмкости для растворителя может быть предусмотрена дополнительная линия для подачи растворителя при промывании. Если для промывочного растворителя используется отдельная ёмкость, в случае, когда он заканчивается это может привести к серьёзному нарушению работы системы. В этом случае в автоинжектор попадает воздух. При этом, поскольку петля-дозатор не промывается надлежащим образом, имеют место явления, характерные для попадания в пробу веществ из предыдущих проб. Кроме того, возрастает разброс площадей пиков, поскольку удалить воздух из дозатора непросто. Это – серьёзные ошибки, которых нужно всеми силами избегать. Поэтому следует ежедневно проверять уровень растворителя в ёмкости.
2. Важно также, до какого уровня заполнены жидкостью флаконы для проб. Автоинжектор вводит иглу во флакон и опускает её до определённой высоты над дном флакона. Если уровень жидкости во флаконе ненамного выше кончика иглы, проба будет втянута неточно. Если объём пробы ограничен, необходимо применять вкладыши во флаконы.
3. Следует учитывать также вязкость пробы. При использовании ручного инжектора оператор должен следить за тем, как проба втягивается в шприц. Если вязкость пробы высока, поршень двигают медленно, чтобы она полностью втянулась в шприц. При использовании автоматического пробоотборника наблюдение за уровнем подъёма пробы невозможно. Следовательно, для проб высокой вязкости

автоинжектор нужно запрограммировать на меньшую скорость набора. Заметим также, что меньшая скорость рекомендуется и для растворителей с крайне низкой вязкостью (или коэффициентом поверхностного натяжения). Это предотвращает разрыв столба растворителя в инжекторе (чтобы наблюдать это явление, попробуйте набирать в шприц смесь гексана и диметилсульфоксида при разных скоростях подъёма поршня). Обычно фирма-изготовитель даёт рекомендации на такие случаи.

4. Игла инжектора может забиться материалом мембраны. Это явление по-прежнему случается, несмотря на значительные усилия разработчиков по его предотвращению. Обычно это проявляется в неожиданном уменьшении высоты или полном исчезновении пиков. Зачастую необходима замена иглы.
5. Игла инжектора может быть изогнута или повреждена. В старых конструкциях юстировка устройства позиционирования флакона под иглой была очень тонкой и трудоёмкой работой. Если флакон неверно отцентрован, игла попадает в твёрдый колпачок. Обычно колпачок выдерживает усилия, а игла сгибается, после чего её приходится менять.
6. Повреждение иглы не столь заметно внешне, когда для пробоподготовки используется агрессивный или коррозионно-активный растворитель. Далее этот агрессивный растворитель разбавляется большим количеством подвижной фазы и, скорее всего, не оказывает столь заметного влияния на остальную систему. Классическим примером такого рода является соляная кислота: даже разбавленная, она быстро разъедает элементы из нержавеющей стали. Если такие условия пробоподготовки совершенно необходимы, следует обязательно систематически контролировать иглу визуально и, при необходимости, заменять её. Если признаки коррозии или изменения цвета заметны снаружи иглы невооружённым глазом, скорее всего, внутри она тоже повреждена. Тогда необходимо заменить иглу.
7. Испарение растворителя из пробы после прокола мембраны. В некоторых случаях (чтобы сэкономить время на подготовке стандартов или средства на флаконах и пр.) в серии опытов вводят стандарты из одного и того же флакона несколько раз. Когда серия длительна, а растворитель, использованный для приготовления стандарта достаточно летуч, площадь пика стандартного вещества на хроматограмме может постепенно увеличиваться (поскольку растворитель испаряется из флакона, т.е. концентрация стандарта в пробе растёт).

Если повторное использование вещества из одного флакона необходимо, после прокола следует поставить на флакон новый колпачок.

8. В большинстве автоматических пробоотборников шприц расположен так, чтобы допускать визуальный осмотр. Иногда внутри шприца образуется воздушная полость. Это может произойти при переходе на работу с новой ёмкости с растворителем, если при этом воздух попадает в магистраль подачи, быть следствием износа или дефекта уплотнений либо неплотной затяжки фитингов. В любом случае, если воздушная полость в стеклянном шприце видна, необходимо выполнить повторное заполнение шприца. Если в результате неисправность не устраняется, следует проверить шприц и соединительные элементы на предмет подсоса воздуха.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ И 3. **Случайные отклонения результатов при работе с автоинжекторами имеющими функцию автоматического разбавления**. Полученные результаты демонстрируют не обязательно больший разброс, а, скорее, систематическое отклонение, изменение формы пика или времени удерживания анализируемых веществ.

УСТРАНЕНИЕ. В этом случае наиболее вероятными представляются три основных источника ошибки.

1. Используется неподходящий растворитель для разбавления. Это влияет чаще всего на форму пиков или времена удерживания. Такое происходит, когда к работе приступает новый оператор, а ёмкость с промывочным растворителем не заменили. При замене следует перевести все соединительные трубопроводы на новый растворитель, т.е. промыть их объёмом, значительно превышающий их собственный.
2. Неправильно подобрано соотношение исходного объёма пробы и растворителя для разбавления. К сожалению, это зачастую случайное и неконтролируемое явление. Если это происходит в одном опыте, единственное, что можно предпринять, – обработать результаты статистически, чтобы выяснить возможное присутствие систематической погрешности. Если же при повторном вводе пробы просто получен разброс значительно больше нормального, это можно попытаться устранить. Для этого следует выполнить ряд повторных опытов, вводя заранее разбавленные пробы (без автоматического разбавления). Если при этом разброс снижается до нормальных пределов, значит ошибка, скорее всего, возникает в процессе автоматического разбавления. Подаваемый объём определяется с помощью растворителя известной плотности (см. табл. 7 в Приложении).

При этом необходимо использовать самый удобный растворитель обладающий самой высокой плотностью. Следует поддерживать температуру как можно ближе к приведенной в таблице 7. Необходимо взвесить флакон с колпачком, затем подать растворитель во флакон и снова взвесить. Подаваемый объём вычислить, как частное от деления массы растворителя на его плотность

3. Проба не полностью перемешана перед отбором. Возможно, эту ошибку удастся устранить, наблюдая визуально процесс разбавления. Другой подход состоит в том, чтобы снять пробную хроматограмму с разбавлением пробы. Затем перед вводом пробы взболтать флакон. Если площади пиков не изменились, проба была изначально полностью перемешана. Если же площади отличаются, проба была не полностью перемешана, либо объёмы вводимых проб были различны.

3.9. Колонки

Колонка – важнейший элемент системы ВЭЖХ, поскольку именно в ней происходит разделение. Систематическая идентификация пиков и воспроизводимое определение концентрации анализируемых веществ возможны, только когда рабочие параметры колонки, в частности, её эффективность, превышают некие минимальные значения. Следовательно, крайне важно выбрать материал набивки, дающий воспроизводимые результаты от колонки к колонке и от партии к партии.

Чтобы избежать попадания дефектных или плохо заполненных колонок к пользователю, изготовители обычно проводят предпродажные испытания всех колонок. К сожалению, условия этих испытаний, т.е. аналиты и подвижная фаза, редко совпадают с теми, с которыми будут работать в лаборатории. Изготовитель подбирает испытательные аналиты с единственной целью: *доказать самому себе*, что изготовленный и набитый в колонку материал имеет достаточно малый разброс параметров в разных партиях и в одной серии колонок. Очень удачно, что в большинстве случаев при этом разброс рабочих параметров материала набивки удовлетворяет и конечного потребителя.

Однако, чтобы аналитик мог сказать, что не только параметры колонки соответствуют паспортным, но и вся система ВЭЖХ функционирует надлежащим образом, следует разработать системы показателей для каждого анализа по отдельности. Эти показатели зависят от колонки, приборной части, детектора и собственно анализа, причём определяются они при валидации методики. После получения новых колонок каждую из них необхо-

димо испытать в соответствии с протоколом, описанным в конкретной методике, чтобы убедиться, что их показатели приемлемы. Далее, после таких приёмочных испытаний, показатели колонок контролируются в каждой серии аналитических опытов. Эти показатели принадлежат к числу *параметров пригодности системы*. Более полно этот вопрос рассматривается в разделе 3.12.

Набитая колонка состоит из трёх независимых частей: конструкционных элементов (трубка, фритты, фитинги), материала набивки и межзёренного объёма (пространства между частицами набивки). Если материал набивки выбран, и колонка им упакована, данный материал называется просто «набивкой» колонки. Потоки подвижной фазы внутри колонки определяются структурой набивки, числом и размером пор материала. Каналы, по которым проходит подвижная фаза, располагаются как в порах зёрен набивки, так и между ними. Любой удар или резкое физическое воздействие могут привести к нарушению структуры каналов, вследствие чего параметры колонки сильно изменятся. Следовательно, колонку следует оберегать от ударов, не ронять, не изгибать и не прилагать к ней избыточные усилия.

Поскольку свыше 80 % наиболее широко используемых сорбентов ВЭЖХ производятся на основе силикагеля, далее будет рассматриваться, в основном, именно этот материал. Поскольку поверхность силикагеля весьма неоднородна, процесс удерживания не сводится к одному механизму.

3.9.A Механизмы удерживания в ВЭЖХ

Как указывалось в главе 2, поверхность силикагеля неоднородна. На ней, по сути, имеются три различные химически структуры: привитая фаза, основа – окись кремния, заканчивающаяся рядом свободных силанольных групп разных типов, а также включения в виде ионов металлов. Соответственно, присутствуют три различных по химизму механизма удерживания. В обращённо-фазной хроматографии привитая фаза вступает в *гидрофобные взаимодействия*. Эти взаимодействия по природе сугубо неполярные. Остаточные не дериватизированные силанольные группы вступают в *силанофильные взаимодействия*. В основе этих взаимодействий лежит образование водородных связей. Наконец, имеющиеся ионы металлов приводят к появлению третьего типа взаимодействий – *металлофильных*. Это – ион-дипольные взаимодействия. Следует также помнить, что ионы металлов изменяют кислотно-основный характер близлежащих силанольных групп.

В случае сорбентов C_{18}, привитая фаза выглядит, как своеобразная гидрофобная щётка, прикреплённая к поверхности. Точная конфигурация групп на поверхности и то, насколько они выступают в подвижную фазу,

зависит от состава последней. В общем виде, молекулы привитой фазы никогда не простираются в подвижную фазу полностью. В слабых элюентах молекулы привитой фазы C_{18}, скорее всего, будут сворачиваться, «ложиться» на поверхность, перекрываться друг с другом и образовывать множественные агрегаты. Именно в этой среде происходит разделение молекул анализируемых веществ.

Чтобы определяемые вещества перешли из подвижной фазы на поверхность, должны произойти три процесса. Во-первых, должны быть удалены молекулы растворителя, окружающие молекулу растворённого вещества (десольватация аналита). Во-вторых, одновременно с этим, молекулы подвижной фазы, адсорбированные поверхностью, должны быть удалены с привитой фазы (десольватация поверхности). Третий процесс, протекающий после первых двух, состоит во взаимодействии растворённого вещества с привитой фазой. Относительная сила указанных взаимодействий определяет время пребывания растворённого вещества в подвижной фазе и на поверхности. В большинстве случаев хроматографисту хотелось бы, чтобы никакие другие процессы не происходили.

К сожалению, процесс разделения далеко не идеален. Если аналит способен образовывать водородные связи, имеет место второе, силанофильное, взаимодействие, зачастую более сильное. Более всего этому подвержены первичные и вторичные амины, а также карбоновые кислоты. Ещё более осложняет дело то, что прочность водородных связей с силанольными группами различна, так как различны кислотные свойства этих групп из-за присутствия ионов металлов в структуре окиси кремния. Итак, разделяемые вещества взаимодействуют с неоднородной поверхностью сорбента, где силанольные группы различаются по своим кислотным свойствам и прочности образуемых водородных связей. Чтобы прояснить важность этих взаимодействий, представим себе необработанную поверхность силикагеля, на которой имеется около 8 мкМ/м^2 силанольных групп. После дериватизации и энд-кэппинга поверхности почти 50 % этих групп остаются не модифицированными. Как правило, силикагель имеет удельную поверхность около 250 м^2/г; в колонке длиной 150 и диаметром 4,6 мм может находиться около 1,2 г силикагеля. Даже по заниженной оценке в обычной колонке C_{18} будет иметься около 2 мМ не дериватизированных силанольных групп на поверхности. Представим себе также характерный анализируемый раствор, в котором определяемое вещество содержится в количестве 200 мкМ/мл; в хроматограф вводится проба объёмом 10 мкл. Иначе говоря, в процессе анализа в колонку вводится 2 мкМ определяемого вещества, т.е. в тысячу раз меньше, чем свободных силанольных групп на поверхности.

Если силикагель не легируют ионами металла умышленно, можно полагать, что металлофильные взаимодействия играют пренебрежимо малую роль в реальном удерживании аналитов. Впрочем, возможны исключения, когда аналиты имеют ионный характер с большим зарядом, а на кислотность силанольных групп, как указывалось выше, влияют главным образом ионы металлов.

Кроме описанных выше механизмов удерживания, важным с точки зрения описания системы, является случай, когда аналит ею не удерживается. В этом случае время выхода такого аналита является мерой объёма системы, так называемого «мёртвого объёма». Неудерживаемый аналит называют маркером мёртвого объёма. Мёртвый объём системы, v_0, определяется как произведение времени выхода маркера мёртвого объёма, t_0, и расхода F:

$$F \times t_0 = v_0.$$

Выбор того или иного маркера мёртвого объёма можно обсуждать: в литературе приводятся разные рекомендации – от урацила и иона нитрата до подвижной фазы, обогащённой одним из ингредиентов. Важность определения мёртвого объёма или времени выхода неудерживаемого компонента состоит в том, что существенный параметр удерживания, коэффициент ёмкости, k', определяется настолько же точно, насколько мёртвый объём (или время выхода неудерживаемого компонента):

$$k' = (t_r - t_0)/t_0,$$

где t_r – время удерживания определяемого вещества. Чтобы быстро оценить эффективность системы после замены трубопровода или колонки, можно замерить мёртвый объём. Увеличение v_0 говорит о возможных неисправностях: течи, неправильном выборе трубопровода, слишком длинных соединениях, отсутствии соединения (например, зазоре между торцом трубки и муфтой), полости в начале колонки либо об ошибке измерения скорости потока подвижной фазы.

3.9.Б Монтаж и эксплуатация колонок

ИСТОЧНИК ВОЗМОЖНЫХ ЗАТРУДНЕНИЙ К 1. **Загадочная стрелка на колонке, указывающая направление потока**.

ОЪЯСНЕНИЕ. При набивке колонка действительно приобретает ориентацию, т.е. у неё есть головная часть (вход) и оконечная (выход). Хотя в своё время были реальные причины точно помечать на колонке, с какой стороны вход, сейчас это уже не имеет смысла, при условии, что колонка

заполнена силикагелем в заводских условиях и испытана. Новая колонка должна вести себя одинаково, независимо от направления потока. Почему же изготовители по-прежнему наклеивают на колонки этикетки со стрелкой, указывающей направление потока?

Первое, что напрашивается, – сказать, что так делали всегда, и хроматографист ждёт, что на колонке будет этикетка со стрелкой. Второй, более правильный, вариант ответа состоит в том, что соблюдать направление потока крайне важно, если колонку на время выводят из работы. При длительной эксплуатации колонки набивка в головной её части сильнее стареет и в большей степени растворяется. В состаренных колонках растворение набивки может зайти настолько далеко, что в головной части образуется небольшая полость. Хотя при этом будет наблюдаться размывание пиков, ухудшение характеристик колонки обычно происходит постепенно, так что она сохраняет эффективность разделения долгое время. Если изменить ориентацию в хроматографе состаренной колонки, в головной части которой уже образовалась полость, набивка сместится, заполняя полость. Это тем более вероятно, чем старше колонка и чем выше перепад давления на ней. Разрыв набивки приводит к появлению сдвоенных пиков на хроматограммах и других неприемлемых результатов. Следовательно, стрелка на колонке указывает хроматографисту, как была сориентирована колонка в предшествующей эксплуатации, *а не то*, что приемлемые результаты на новой колонке можно получить, только установив колонку по направлению потока, указанному стрелкой.

ИСТОЧНИК ВОЗМОЖНЫХ ЗАТРУДНЕНИЙ К 2. **Неправильные испытания новых колонок на соответствие рабочим параметрам**.

УСТРАНЕНИЕ. Данный этап имеет место *сразу по получении колонки*. Вряд ли разумно полагать, что изготовитель даёт гарантию на колонку в течение неопределённого срока. Прежде всего, следует проверить не повреждена ли внешняя упаковка. Если повреждения отсутствуют, необходимо записать дату получения. Если обнаружены повреждения, нужно сделать соответствующую запись в товаросопроводительных документах. Далее, извлечь колонку из внешней упаковки и осмотреть. Опыт показывает, что несоответствия встречаются на удивление часто: колонка изогнута, заглушек по концам нет или они отвинчены, этикетки отсутствуют, хроматограмма испытаний колонки отсутствует и т. д. Если колонка имеет физические повреждения, необходимо вернуть её изготовителю.

Следует проверить соответствие серийного номера и характеристик колонки (т.е. тип материала набивки, размер зерна, размеры колонки) заказу и данным, указанным на хроматограмме испытаний. Убедиться, что все га-

рантируемые параметры, полученные при испытаниях (например, наименьшее число теоретических тарелок, разрешение, асимметрия) соответствуют заявленным в паспорте. Если обнаружены несоответствия, следует сообщить об этом изготовителю. Наконец, необходимо *провести испытания рабочих параметров колонки*. Такая предварительная валидация, довольно редко осуществляемая в современных перегруженных работой лабораториях, в дальнейшем поможет свести к минимуму простои приборов. Испытания колонки вскоре после её получения с завода показывают, насколько хорошо была колонка упакована и выдержала ли она транспортировку. Если таких испытаний не было, изготовитель вправе заявить, что ухудшение характеристик колонки вызвано неправильным её хранением.

ИСТОЧНИК ВОЗМОЖНЫХ ЗАТРУДНЕНИЙ К 3. **Неправильный монтаж колонок**.

УСТРАНЕНИЕ. При установке колонки для испытаний или эксплуатации необходимо соблюдать некоторые предосторожности. Во-первых, проверить, какой элюент был использован при хранении. Его состав указывают на испытательной хроматограмме или в документации, которой комплектуется колонка. Для новых колонок обычно это тот же элюент, который был использован при испытаниях рабочих параметров. Необходимо обратить также внимание на то, что для колонки, которые систематически использовались в обращённо-фазном или нормально-фазном режимах (например, с пропилнитрильными, аминопропиловыми или диольными функциональными группами), применяют для хранения растворители для обращённо-фазной или нормально-фазной хроматографии. Если для хранения использован гексан, а в системе ВЭЖХ подвижная фаза представляет собой смесь ацетонитрила с водой, в головной части колонки образуется система несмешиваемых жидкостей, что зачастую приводит к аварийной остановке насоса из-за слишком большого перепада давления. Если имеет место такая несовместимость растворителей, сначала необходимо промыть колонку универсальным растворителем (например, изопропиловым спиртом или ацетоном), и лишь затем приступить к её уравновешиванию с элюентом, выбранным для хроматографии.

Во-вторых, независимо от состава элюента и срока эксплуатации колонки, монтаж следует выполнять в описанной ниже последовательности:

1. Удалить заглушки с обоих концов колонки.
2. Задать малую скорость подачи насоса (от 0,1 до 0,2 мл/мин), убедиться, что подвижная фаза проходит через соединительную трубку, к которой должна быть присоединена головная часть колонки.

3. При малом расходе подвижной фазы присоединить головную часть колонки к соединительной трубке. Такая последовательность действий предотвращает попадание в систему воздуха. Затянуть соединение и убедиться в отсутствии течи.
4. Подставить ёмкость для сброса на выход колонки. Убедиться, что вскоре после подключения колонки из неё начинает вытекать подвижная фаза.
5. После стабилизации потока проверить давление в системе, после чего, понемногу увеличивать расход. Необходимо помнить, что на колонке имеет место градиент давления, так что в её начале общий перепад давления будет значительно выше, чем можно было бы предполагать только по увеличению расхода.
6. Пропустить через колонку от пяти до десяти её объёмов элюента (примерно 1 мл на сантиметр длины колонки внутренним диаметром 4,6 мм).
7. Уменьшить расход до 0,1 – 0,2 мл/мин, затем подключить на выходе колонки детектор. Убедиться, что вместе соединения нет течи, затем установить нужное значение скорости потока.

Такая последовательность действий сводит к минимуму вероятность попадания в детектор пузырьков воздуха, твёрдых микрочастиц и других загрязнителей.

ИСТОЧНИК ВОЗМОЖНЫХ ЗАТРУДНЕНИЙ К 4. **Неправильное длительное хранение колонок**. Если на колонку неправильно установлены заглушки, или если для хранения использован несовместимый растворитель, после повторного ввода в эксплуатацию колонка не работает нормально.

УСТРАНЕНИЕ. На правильность условий хранения колонок, выведенных из эксплуатации, часто не обращают достаточного внимания. Обычно оператор так торопится перевести систему на новый анализ, что забывает, что придёт время, и нужно будет торопиться переводить систему на анализ, который только что делали.

В большинстве случаев для хранения колонки нужно использовать растворитель без буфера (без модификатора подвижной фазы). Колонки для обращённо-фазной хроматографии лучше всего хранить в чистом растворителе или смеси растворителей, обладающих долговременной устойчивостью (например, ацетонитрил или метанол с водой). Нормально-фазные колонки лучше хранить в изооктане, чем в более летучем гексане. Необходимо уравновесить колонку с растворителем для хранения и нанести на ко-

лонку маркировку с датой, а также составом растворителя для хранения. Этим исключается путаница при повторном вводе колонки в эксплуатацию.

Исключение из правила о неприменении использования буфера для хранения могут составить колонки для ионообменной и ион-парной хроматографии. Колонки для ионообменной хроматографии обычно сопровождаются рекомендациями изготовителя по поводу использования конкретной жидкой фазой определенного состава для хранения. Следует придерживаться этих рекомендаций. Уравновешивание колонок для ион-парной хроматографии может потребовать настолько много времени (ион-парный реагент очень трудно удалить полностью), что проще для хранения использовать растворитель, содержащий этот реагент. В любом случае на колонку должна быть нанесена маркировка с составом элюента и датой.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 5. **Установка новой колонки приводит к исчезновению пиков или резким изменениям высоты пиков и времен удерживания**. После замены колонки зачастую изменяются не только времена удерживания анализируемых веществ, но и многие другие показатели.

УСТРАНЕНИЕ. Изменение времён удерживания и уменьшение высот пиков могут быть обусловлены изменениями в колонке, инжекторе, пробе и детекторе. Все эти компоненты нужно испытывать по отдельности. Впрочем, одна из самых распространённых ошибок состоит в том, что пробу вводят, не дождавшись полного уравновешивания системы. Последовательность операций при монтаже колонки, описанная выше в К 3, рассчитана на то, чтобы этого избежать. Но иногда особенности хроматографического разделения требуют промывания значительно большим объёмом (например, если используется проходная, т.е. встроенная в тракт потока, система дегазации).

Весьма чувствительным ко всяким изменениям в хроматографической системе является перепад давления. По возможности, следует регистрировать значения перепада давления в начале и конце хроматографического опыта. Кроме того, нужно регистрировать общий перепад давления на системе и другие важные рабочие параметры. В особенности это существенно при частой смене колонки. Небольшие флуктуации давления (в пределах от ± 5 до ± 10 %) могут быть обусловлены изменениями температуры, состава подвижной фазы, процессами, происходящими внутри самой колонки. Если же перепад давления меняется сильнее, не исключена серьёзная неисправность. Поскольку самый большой вклад в общий перепад давления вносит колонка, обычно изменения перепада давления ассоциируют с изменениями в колонке.

Если перепад давления на колонке возрастает, зачастую это говорит о том, что на входной фритте, внутри неё или в головной части колонки имеет место выпадение твердых солей или осаждение какого-либо вещества. Причиной этого могут быть неправильное хранение (например, заглушка была затянута неплотно, растворитель, содержащий буфер, испарился из колонки, что привело к осаждению соли из буфера) либо накопление в течение длительного времени не элюированных составляющих анализируемых проб (например, микрочастиц). В некоторых случаях аналит необратимо связывается с осаждёнными веществами, что приводит к потере пика. Очистка колонки и замена фритты рассматриваются в К6.

Далее, если монтаж колонки выполнен успешно, и перепад давления приемлемый, необходимо убедиться в правильности состава подвижной фазы и скорости потока (замерить его непосредственно). Проверить правильность значения объёма вводимой пробы, удостовериться в том, что проба для ввода в хроматограф отбирается из той самой ёмкости, где она хранится, при этом проба имеет надлежащую концентрацию. Если используется автоматический пробоотборник, следует проверить, достаточно ли высок уровень пробы во флаконе, из которого будет отбираться проба, и полон ли резервуар для промывного раствора. Проверить необходимо также установки детектора (ослабление, кратность, поправка).

Если пики всё равно не появляются, необходимо приготовить раствор, содержащий аналит, генерирующий сигнал детектора (например, урацил, фенол или ацетон для обращённо-фазного варианта, толуол – для нормально-фазного, если используется ультрафиолетовый детектор на длине волны 254 нм) в количестве, достаточном для получения легко обнаруживаемого детектором сигнала. Затем следует ввести пробу этого раствора в хроматограф. Если пик по-прежнему не появляется, нужно отключить подачу подвижной фазы и демонтировать колонку. Затем подключить инжектор непосредственно к детектору и ввести пробу. Если детектор исправен, будет получен пик. Если пик отсутствует, стоит проверить, исправен ли инжектор.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 6. **Перепад давления на колонке неожиданно резко возрастает**.

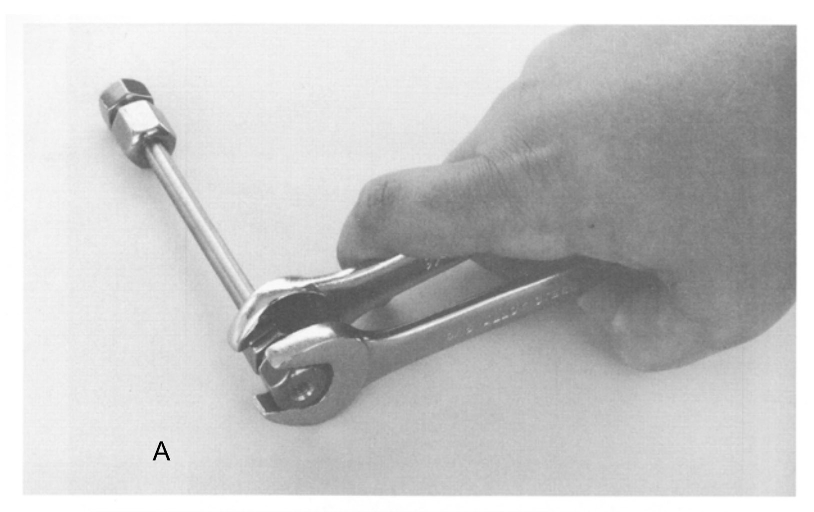
УСТРАНЕНИЕ. Чаще всего перепад давления в системе резко возрастает, если введённая проба содержит микрочастицы или загрязнения. Обычно это происходит, когда пробу не фильтруют или не обрабатывают каким-либо другим способом. Зачастую скачок давления не настолько высок, чтобы произошла аварийная остановка системы. Однако по окончании серии опытов нужно заняться устранением неисправности. В любом случае,

микрочастицы, скопившиеся во входной фритте или головной части колонки, требуют удаления.

Наиболее безопасный подход к удалению сторонних веществ из входной фритты и головной части колонки состоит в *обращении потока*, т.е. подаче подвижной фазы через колонку в обратном направлении. Для этого необходимо демонтировать колонку, подключить её выходной конец к инжектору и прокачивать подвижную фазу на небольшом расходе прямо в ёмкость для сброса (*ни в коем случае не через детектор*). При этом обязательно нужно контролировать перепад давления. Если при обращении потока перепад давления не будет постепенно уменьшаться, возможно, имеет место накопление сторонних веществ внутри колонки. Тогда, через колонку необходимо прокачать сильный элюент, также в обратном направлении, чтобы вымыть эти вещества (для этой цели подходят, например, 100 %-ные ацетонитрил и метанол, или, если колонка использовалась для разделения аналитов с большими протонируемыми молекулами – смесь изопропилового спирта с водой и тетрафторуксусной кислотой в соотношении объёмных долей 80:20:2). В этом случае недостаточно просто отслеживать перепад давления, поскольку изменилась вязкость растворителя. Затем следует прокачать через колонку от 10 до 20 её объёмов и снова уравновесить с подвижной фазой первоначального состава. Сравнить перепад давления до очистки и после очистки и полного уравновешивания с подвижной фазой.

Если колонка не очищается, дальнейшее вмешательство (которое, скорее всего, приведёт к повреждению колонки) состоит в том, чтобы демонтировать и заменить фритту. Здесь крайне важно не затронуть в процессе замены набивку в головной части колонки. (Это *последнее средство*. При вскрытии колонки гарантия изготовителя утрачивает силу.) Порядок действий (рис. 3.35) будет следующим.

1. Неподвижно зафиксировать с помощью гаечного ключа оконечную часть фитинга колонки.
2. Отвинчивать внутреннюю гайку гаечным ключом, пока она полностью не отделится от внешнего фитинга.
3. Установить колонку перпендикулярно поверхности стола ослабленным фитингом вверх.
4. Осторожно сдвинуть фитинг с верхней части колонки. В случае неразъёмного соединения фритты с фитингом, заменить весь узел. Если фритту можно отделить от фитинга, осторожно (пинцетом) удалить фритту.
5. Установить новую фритту на верхний торец колонки. Обязательно подобрать фритту той же толщины, что демонтированная, иначе



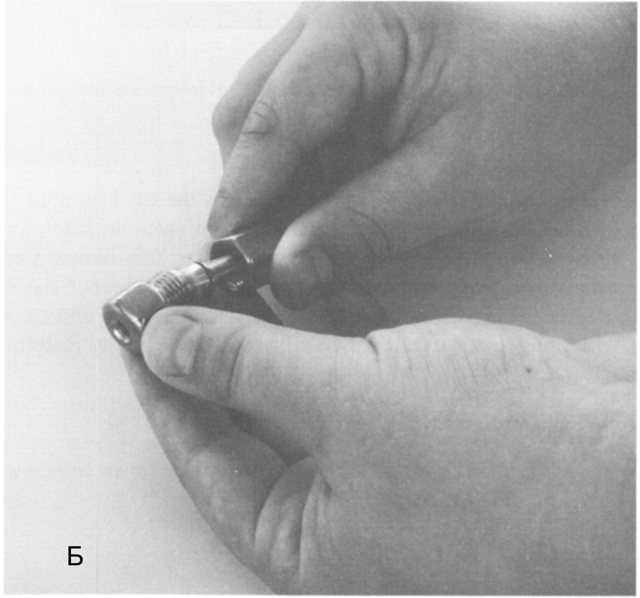


Рис. 3.35. Демонтаж фритты колонки. (А) Захватить гаечным ключом (ближайшим на фото) фитинг, упереть ключ в стол. Вторым ключом, нажимая вниз, ослабить внутреннюю гайку. Отвинчивать гайку до полного ослабления. (Б) Осторожно отделить фитинг от гайки и корпуса колонки. После этого сразу же установить колонку вертикально. *(продолжение на следующей странице)*

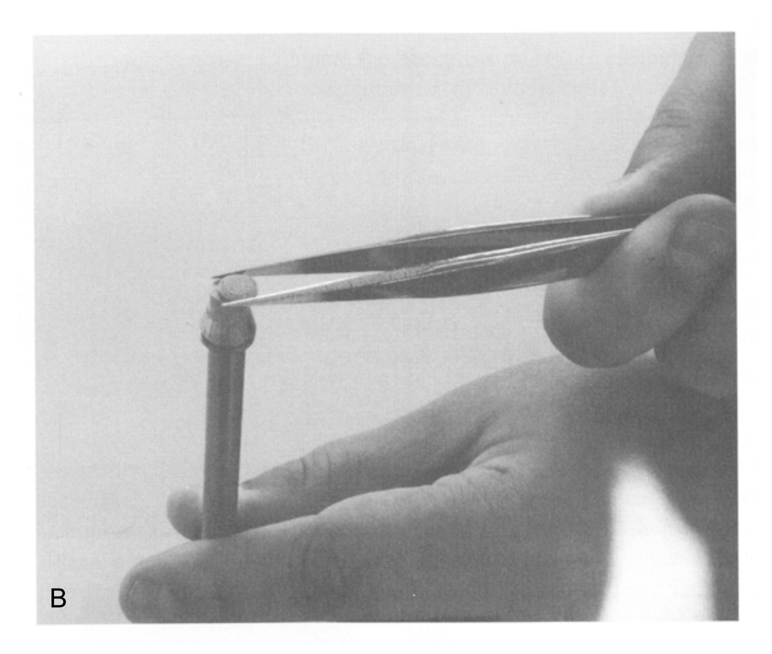


Рис. 3.35. *(продолжение)* (B) Осторожно удалить фритту. Заменить фритту и повторить вышеуказанные действия в обратной последовательности.

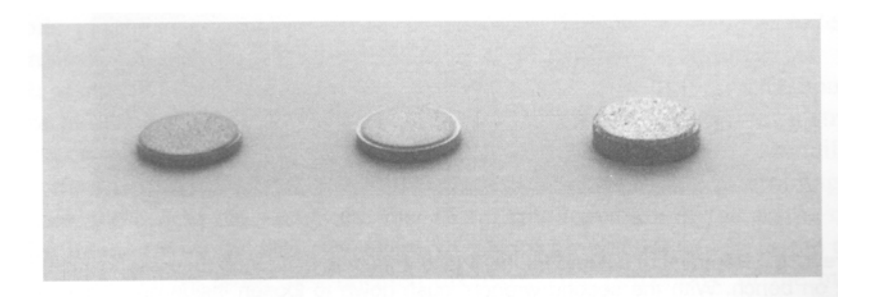


Рис. 3.36. Фритты разной толщины (увеличивается слева направо). Подобрать фритту точно такой же толщины, как демонтированная.

фитинг будет протекать (рис. 3.36). Также следует заменить распределительную пластинку, если она используется.

6. Надеть фитинг на концевую часть колонки и удерживать его.
7. Вручную навинтить гайку на фитинг.

8. Зафиксировать неподвижно оконечную часть фитинга гаечным ключом. Затянуть гайку на фитинге.
9. Обязательно удалить из колонки воздушный пузырёк, попавший через фритту, перед тем, как подключить колонку к детектору.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 7. **Время удерживания пика тем больше, чем выше концентрация аналита**. Такое явление чаще всего наблюдается при анализе основных аминосоединений.

УСТРАНЕНИЕ. На рис. 3.37 А и Б показаны значения k' 2,6-диаминопиридина (ДАП) и соответствующие формы пика на силикагелевой колонке C_{18} при уменьшающейся концентрации аналита в пробе. В качестве подвижной фазы использована смесь метанола с водой без модификатора. Чтобы избежать подобных ошибок, нужно выявить их источник.

Необходимо помнить, что на поверхности силикагеля имеется не только привитая фаза, но и остаточные силанольные группы. Силанольные группы образуют сильные водородные связи с основными соединениями, что является главной причиной образования «хвостов» или размывания пиков. Следует обратить внимание, что ниспадающая часть пика (срез) довольно удлинена даже при самой высокой концентрации ДАП. Это обусловлено тем, что небольшая часть молекул растворённого вещества взаимодействует с силанольными группами, сильно удерживающими эти молекулы. По мере того, как количество молекул аналита уменьшается, их относительная часть, испытывающая указанное взаимодействие, возрастает, срез пика удлиняется более заметно.

Когда количество аналита во введённой пробе, уменьшаясь, приближается к общему количеству доступных силанольных групп на поверхности сорбента, силанофильное взаимодействие становится преобладающим механизмом удерживания, и k' увеличивается. Поскольку силанольные группы неоднородны по природе, это увеличение продолжается по мере уменьшения концентрации, т.к. центры, где проявляется более сильное связывание, начинают в большей степени влиять на удерживание. Указанное явление надлежит исключить, поскольку, например, в клиническом анализе (где концентрация аналита может меняться в широких пределах) идентификацию зачастую осуществляют по времени удерживания.

С этой целью следует принять ряд мер. Прежде всего, использовать модификаторы подвижной фазы, чтобы предотвратить взаимодействие аналита с поверхностью. Не совсем обычный подход состоит в том, чтобы в качестве модификатора добавить к аналиту основный амин, например, триэтиламин. Молекулы этого модификатора конкурируют с анализируемым амином по отношению к силанольным группам. Если используются основ-

ные модификаторы подвижной фазы, обязательно следует использовать насыщающую предколонку или защитную предколонку, чтобы защитить аналитическую колонку от быстрого выхода из строя.

Более распространённый подход к использованию модификаторов подвижной фазы состоит в том, чтобы добавить сильную органическую кислоту, что приведёт к полному протонированию амина, а значит, ослабит силанофильные взаимодействия. Чаще всего здесь используют трифторуксусную кислоту. Концентрация таких модификаторов должна быть гораздо выше, чем аналита, обычно она составляет, в объёмных долях, от 0,1 до 0,5 %. Сильным акцептором водородных связей является также тетрагидрофуран. Он представляет собой эффективный модификатор и используется в объёмных долях от 1 до 5 %.

Промышленностью выпускаются также специальным образом обработанные колонки, в которых влияние остаточных силанольных групп значительно снижено. Обработка может представлять собой деактивацию поверхности или энд-кэппинг. Такие колонки специально рекламируют, поскольку удлинение «хвостов» пиков аминосоединений и его предотвращение занимает хроматографистов довольно давно.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 8. **Постепенное увеличение пика при последовательном вводе нескольких одинаковых проб**. Это явление обычно наблюдается при анализе белков или других макромолекул.

УСТРАНЕНИЕ. Адсорбция белков на разных элементах хроматографической системы – постоянный источник ошибок. Дело в том, что обычно работают со столь низкими концентрациями белков, что на центрах адсорбции может задерживаться заметная часть их молекул. Адсорбция имеет место в основном на трёх элементах хроматографа: колонке, соединительных трубках и инжекторе.

Установлено, что на инжекторах и трубках колонок из нержавеющей стали наблюдается сильная адсорбция белков. Адсорбция часто сопровождается денатурацией. В процессе денатурации трёхмерная структура молекулы белка нарушается, образуются множественные центры взаимодействия молекул с поверхностью металла. Вследствие этого, процесс десорбции обычно определяется кинетикой (в отличие от быстрого, определяемого термодинамикой, процесса достижения равновесного состояния, который чаще всего встречается при хроматографическом разделении). Сильно связанный с поверхностью денатурированный белок, в конечном итоге, десорбируется с этих элементов системы, но настолько медленно и в таком малом количестве, что не обнаруживается детектором. Но ошибки, источником которых служат вышеуказанные элементы хроматографической системы, полностью перекрываются влиянием адсорбции в колонке, поскольку

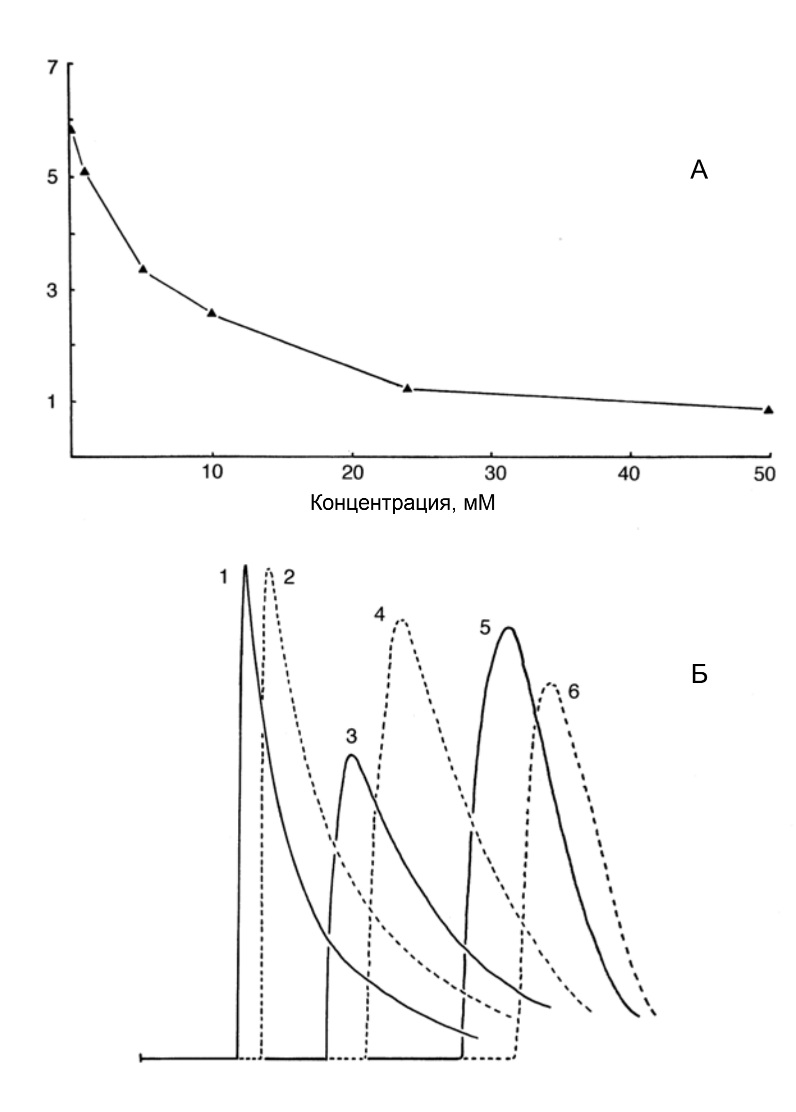


Рис. 3.37. (А) Зависимость *k′* от концентрации для 2,6-диаминопиридина (ДАП). (Б) Профили пиков и времена удерживания при уменьшении концентрации (значения соответствуют приведенным на графике зависимости *k′*): кривая 1 – 50 мМ; кривая 2 – 25 мМ; кривая 3 – 12,5 мМ; кривая 4 – 6 мМ; кривая 5 – 3 мМ; кривая 6 – 1 мМ. Пики для малых концентраций увеличены для приведения к одному масштабу.

в трубопроводах удельная поверхность очень мала. Соответственно, главная неприятность, которая может случиться с соединительными капиллярами – это их закупоривание из-за осаждения белков на поверхности в течение длительного времени. Чтобы избежать ошибок, необходимо периодически очищать трубопроводы. Иной подход состоит в том, чтобы вообще исключить из системы нержавеющую сталь. Чаще всего вместо неё для изготовления соединительных трубопроводов, инжекторов, фритт и колонок используют полиэфирэфиркетон (ПЭЭК). Применяется также титан. Эти материалы считают биологически совместимыми, но в действительности они просто вызывают меньшую денатурацию белка (и имеют меньше центров адсорбции), чем нержавеющая сталь.

В колонке центры адсорбции имеются, как на фритте и на поверхности сорбента. Поверхность фритты значительно меньше, чем материала набивки (до 100 $см^2$ на фритте, свыше 100 $м^2$ на колонке). Однако фритты, как и соединительные трубки, подвержены закупориванию. Вместо фритт из нержавеющей стали, можно использовать изделия из ПЭЭК и титана.

Теперь следует рассмотреть процессы, происходящие на материале набивки. В случае анализа белков, пробу зачастую готовят в водном буфере и вводят в колонку с гидрофобной поверхностью (например, C_4 или C_{18}). Взаимодействие между белком и молекулами поверхности с гидрофобными связями часто приводит к денатурации белка. Кроме того, на поверхности имеются центры, где возможно образование сильных водородных связей – остаточные силанольные группы. Процесс денатурации здесь идёт медленно, но денатурированный белок очень сильно взаимодействует как с привитой фазой, так и с многочисленными остаточными силанольными группами. Десорбция с последних протекает крайне медленно, обычно настолько медленно, что за время хроматографического опыта это проявляется от появления небольшого «хвоста» пика до сильного размывания пика и даже необратимой адсорбции (т.е. концентрация в элюате оказывается настолько низкой, что не определяется детектором).

В какой степени эти явления проявятся в хроматографическом опыте, зависит от множества переменных. К ним относятся гидрофобность белка, лёгкость его денатурации, природа органической составляющей и её концентрации в пробе и подвижной фазе, характер привитой фазы, количество остаточных силанольных групп на поверхности набивки, температура, промежуток времени между вводами последовательных проб, расход элюента, форма и продолжительность градиента (с учётом времени уравновешивания). Достаточно взглянуть на этот перечень, чтобы понять, почему настолько труден количественный анализ белков. Необходимо обратить внимание на то, что здесь чрезвычайно важны факторы, которые обычно

вообще не влияют или слабо влияют на разделение, определяемое термодинамикой: промежуток времени между пробами, расход, профиль градиента и незначительные изменения характера поверхности набивки (но это наиболее существенные из факторов).

Последствия анализа таких проб для колонки чрезвычайно важны. Представим себе, что в каждой колонке имеется одно и то же количество центров адсорбции, и после ввода подряд нескольких проб все они насыщаются белком. Хроматограммы во всех последующих опытах будут нормальными и воспроизводимыми (серию таких опытов иллюстрирует рис. 3.38). По сути, это напоминает заполнение поверхности сорбента колонки ион-парным реагентом перед анализом. Однако любые изменения типа и количества центров адсорбции от колонки к колонке или от партии материала набивки к партии будут иметь серьёзные хроматографические последствия.

Наконец, изменения концентрации белка в пробе приводят к тем же изменениям времени удерживания, как явления, рассмотренные в разделе 3.2.В. Здесь, впрочем, имеются усложняющие обстоятельства: молекулы белка, в отличие от небольших молекул 2,6-диаминопиридина, присоеди-

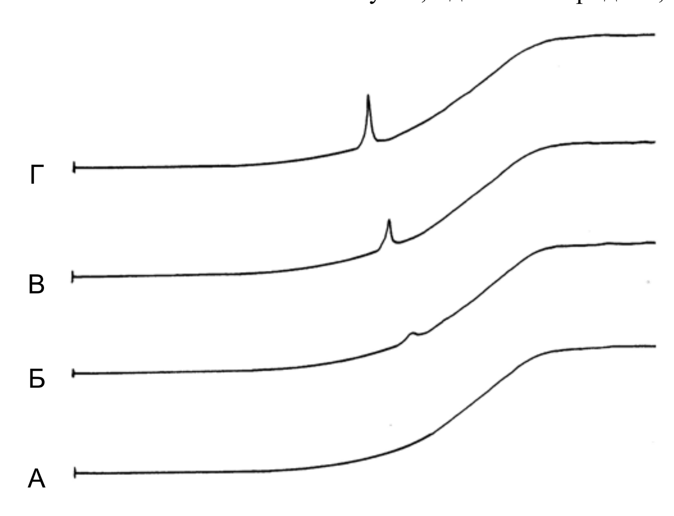


Рис. 3.38. (А) Холостой градиентный опыт: ацетонитрил-вода-тетрафторуксусная кислота (ТФУ) 30:70:0,1 → ацетонитрил-ТФУ 100:0,1 на колонке C_4. (Б) Первая проба яичного альбумина. (В) Вторая проба. (Г) Третья и все последующие пробы. В колонке образовался слой альбумина на активных центрах. Со временем эти центры могут освободиться от белка, если промежуток времени между вводами пробы значительно увеличится или будет выполнена очистка колонки.

няются к множественным центрам адсорбции. При малых концентрациях белка для достижения равновесного состояния, в котором возможно количественное определение, необходимо ввести подряд много проб. Лучше всего, работая с белками и другими макромолекулами, действовать в области наибольших концентраций, ещё приемлемых с точки зрения нагрузки колонки и линейности отклика детектора.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 9. **Потеря эффективности и разрешения**. Проявляется в виде постепенного уменьшения *N* с течением времени.

УСТРАНЕНИЕ. Потеря эффективности хроматографа может быть следствием одного или нескольких одновременно из следующих явлений: старение колонки, накопление в колонке неопределяемых загрязнителей, неправильное приготовление подвижной фазы, изменение температуры системы. Признаками старения являются, помимо потери разрешения, потеря удерживания, заметное удлинение среза пиков, удвоение или расщепление пиков. Примеры потери эффективности иллюстрирует рис. 3.39.

Старение и ухудшение свойств колонки – это естественный процесс. Скорость этого процесса зависит от количества введённых проб, типа

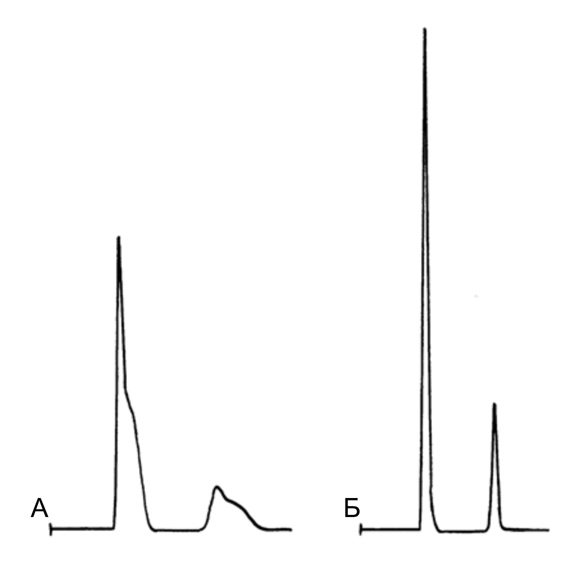


Рис. 3.39. Разделение замещённых фенолов (*о*-фенилфенол и *t*-амилфенол) на колонке C_{18}; подвижная фаза – смесь ацетонитрила с водой. (А) Оба пика расщеплены. Это говорит о загрязнении фритты или осаждении сторонних веществ в головной части колонки. (Б) Тот же опыт после очистки колонки обратной промывкой смеси изопропилового спирта с водой и ТФУ в соотношении 50:50:2.

использованной подвижной фазы, буфера (если он использовался), рабочего давления (зависящего от состава подвижной фазы, температуры расхода) и типа сорбента.

Во многих лабораториях сейчас регистрируют количество проб, введённых до замены колонки. Хотя это и прекрасное средство определения графика регламентных работ по замене колонки, это может, с другой стороны, вызвать неоправданные ожидания по отношению к рабочим параметрам колонки в долгосрочной перспективе. Например, то, что на одной колонке проделана 1000 анализов, и при этом показатели системы не вышли за пределы пригодности, а на другой колонке удалось проделать только 750 опытов, не означает, что вторая колонка была хуже первой или вообще была неприемлемой.

Не менее важным показателем, чем количество введённых проб, является продолжительность анализов (или количество подвижной фазы, пропущенной через колонку). Это особенно важно, когда в подвижной фазе содержатся буферы, значение pH которых менее 2 или более 7, либо концентрация буфера или соли превышает 50 мМ. В приведенных выше случаях возможно, что систему, на которой были проделаны 1000 опытов, отключали на ночь после очередной серии опытов, а та, на которой было выполнено всего 750 опытов, работала и по ночам. Тогда во втором случае общий объём подвижной фазы, прошедшей через колонку, гораздо выше, чем в первом, а значит, можно предполагать более заметное растворение материала набивки.

Помимо этого, все пробы, даже в одной серии поточных анализов, отличаются друг от друга. В них могут иметься в разных количествах вещества, способные к осаждению, которые накапливаются в головной части колонки, не элюируются или крайне медленно элюируются из неё и не определяются детектором. Это – весьма распространённый случай. При таких обстоятельствах можно значительно увеличить срок службы колонки, если регулярно промывать её с обращением потока.

Чаще всего для промывания колонки используют более сильный растворитель, чем для анализа. Если работа осуществлялась в градиентном режиме, для промывания берут более сильный растворитель, чем в конце градиентного опыта (обычно применяют в чистом виде более сильный из растворителей, использованных в градиентном режиме). Например, если разделение проводилось в изократическом режиме на смеси ацетонитрила с водой в соотношении объёмных долей 70:30 (или на таком соотношении оканчивался градиентное разделение), для промывания целесообразно использовать чистый ацетонитрил или смесь ацетонитрила с метанолом в

соотношении объёмных долей 70:30. При этом не следует забывать, что промывание колонки не обязательно будет эффективным тогда, когда применяется элюент, обеспечивающий сильное элюирование анализируемых веществ. В конце концов, аналиты уже могли и выйти из колонки. Скорее, нужно так подобрать растворитель для промывания, чтобы он вымыл из колонки те компоненты пробы, которые не вышли во время анализа. Зачастую это означает, что нужно применить совершенно другой элюент. В обращённо-фазной хроматографии популярны смеси изопропилового спирта с водой с добавкой ТФК в количестве 0,2 – 0,5 %. Изопропиловый спирт используют потому, что это – прекрасный растворитель широкого спектра классов соединений. ТФК – сильная кислота, её назначение – протонизация остатков аминов и карбоксиловых кислот, после чего они легче выводятся из колонки. Через колонку нужно пропустить, по меньшей мере, десятикратный её объём. Очень эффективной мерой является продолжительная промывка колонки в течение ночи при малом расходе. Следует помнить, впрочем, что при работе со смесями изопропилового спирта с водой в системе образуются значительные перепады давления. Необходимо отрегулировать скорость потока соответственно. *При промывании ни в коем случае не следует допускать прохождения растворителя через детектор!*

Ещё один часто встречающийся приём – промывка колонки с обращением потока. Здесь растворитель через колонку пускают в обратном направлении, т.е. оконечный фитинг колонки становится головным. Методика промывки та же, что описана выше. Преимущество такого способа в том, что хорошо вымывающиеся при этом вещества не прогоняются через всю колонку, а сбрасываются из головной её части. Единственная опасность, пожалуй, состоит в том, что, если колонка старая, особенно если в её головной части успели образоваться полости, подача давления во встречном направлении может привести к нарушению целостности набивки. Это чаще всего приводит к резкому, а в ряде случаев – гибельному ухудшению рабочих параметров колонки. Чтобы свести к минимуму вероятность подобного явления, обратную промывку выполнять следует медленно, лучше всего в ночное время. Это позволит обеспечить приемлемый перепад давления за счёт небольшого расхода (например, не более 0,2 мл/мин).

Для того чтобы определить, когда менять колонку, лучше всего регулярно контролировать значения ряда параметров пригодности системы (см. раздел 3.12). Если N или α уменьшаются ниже некоторого предельного значения за необычно короткое время, нужно искать источник неисправности. Если же срок службы колонки близок к ожидаемому, необходимо просто заменить колонку.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 10. **Время выхода пиков определяемых веществ близко к времени выхода неудерживаемого вещества или совпадает с ним**. При этом высота пиков может оставаться неизменной или возрастать в серии одинаковых проб (рис. 3.40). В этом случае при подготовке проб использовался ряд кислот.

УСТРАНЕНИЕ. Этот вопрос рассматривается в разделе о колонках не потому, что соответствующие ошибки связаны с самими по себе колонками, а потому, что определение мёртвого объёма системы всегда крайне

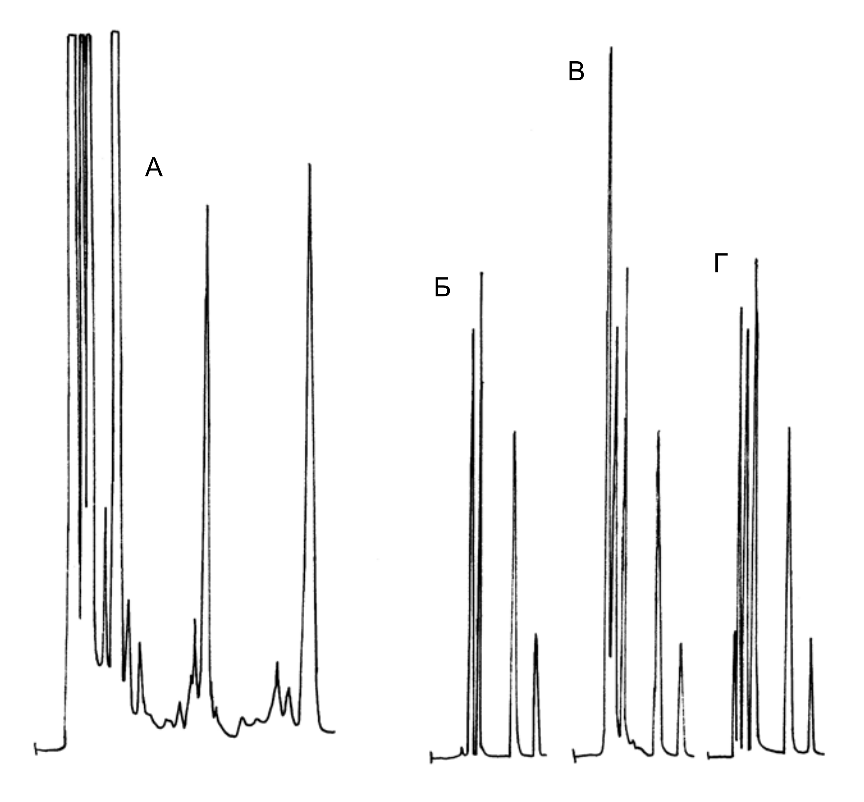


Рис. 3.40. (А) Хроматограмма четырёх кислотных составляющих клюквенного сока, разбавленного водным раствором подвижной фазы (0,1-молярная H_3PO_4), детектирование на длине волны 205 нм. Пробы (В) и (Г) очищены посредством ТФЭ до анализа. (Б) Стандарт, приготовленный в подвижной фазе. Все четыре пика чётко видны. (В) Проба, приготовленная в 1-молярной HCl. Следует обратить внимание на выход большого пика HCl в начале хроматограммы. Аналогичные побочные пики получены при использовании HNO_3 и H_2SO_4. (Г) Проба растворена в 1-молярной H_3PO_4. На хроматограмме присутствует небольшой пик из-за несоответствия концентраций H_3PO_4.

важно. Два основных параметра системы ВЭЖХ – величины её мёртвого и холостого объёмов. Мёртвый объём – это сумма всех объёмов в системе от инжектора до детектора, в допущении, что взаимодействие с набивкой и эксклюзия по размерам не имеют места. Холостой объём включает все объёмы системы от места смешения элюентов до инжектора (трубопроводы, предколонки и фильтр в потоке).

Оценка мёртвого объёма может сразу показать, нормально ли работает система. Ещё важнее это для сравнения двух систем ВЭЖХ. По его значению нетрудно заметить, что в системе имеются излишний внеколоночный объём или течь.

Знание холостого объёма хроматографической системы оказывается существенным для устранения неисправностей и перенесения градиентных методик с одного прибора на другой. Как уже упоминалось выше, градиентный режим элюирования начинается только после того, как изменение в составе подвижной фазы достигает головы колонки, а не немедленно после смешивания подвижной фазы насосом. Холостой объём разных систем насосов может различаться, порой очень существенно (от менее 1 мл до свыше 4 мл).

Какие именно элементы системы вносят основной вклад в мёртвый объём необходимо знать, чтобы избежать получения хроматограмм, на которых время выхода анализируемых веществ близко ко времени выхода пика неудерживаемого вещества. В этом районе хроматограмм часто наблюдаются всплески нулевой линии, связанные с изменением давления, возмущениями показателя преломления из-за плохого подбора растворителей, поглощающими (или активно влияющими на детектор) ионами и загрязнителями.

При изучении результатов, показанных на рис. 3.40, было установлено, что на этапе пробоподготовки начали использовать другую кислоту. Соляная кислота имеет поглощение на малой длине волны, а фосфорная – нет. Кроме того, соляная кислота особенно агрессивна по отношению как к деталям из нержавеющей стали, так и к сорбентам на силикагелевой основе в ВЭЖХ. По мере возможности, не следует использовать соляную кислоту, а заменять её органической (трифторуксусной или уксусной) или менее агрессивной неорганической (например, фосфорной) кислотой. Если это невозможно, необходимо использовать детали хроматографа, выполненные из материалов, устойчивых к агрессивным неорганическим кислотам, например, ПЭЭК.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 11. **Разложение соединений в колонке**. Вещества могут разлагаться внутри колонки из-за реакций при контакте с

подвижными ионами водорода, например, в остаточных силанольных группах, или с ионами металлов, например, имеющимися в матрице силикагеля или адсорбированными на поверхности.

УСТРАНЕНИЕ. Прежде всего, следует проверить, действительно ли появление нового пика обусловлено реакцией разложения. Как вариант, можно сравнить размеры пиков предполагаемого продукта разложения при двух сильно различающихся значениях скоростей потока элюента. Поскольку при большем расходе аналит взаимодействует с колонкой в течение гораздо более короткого времени, чем при меньшем расходе, пик продукта разложения должен соответственно уменьшиться. Если разложение обусловлено факторами вне колонки, значение расхода не должно сказаться на относительных размерах пиков.

Если окажется, что причиной разложения является все-таки колонка, устранить эту ошибку можно одним из четырёх способов. Во-первых, как уже было сказано, можно увеличить расход подвижной фазы, при этом продолжительность контакта с поверхностью сократится, разложение значительно уменьшится или вовсе не иметь места.

Во-вторых, можно добавить в подвижную фазу силанофильный поглотитель. Концентрация поглотителя должна быть такой, чтобы помешать аналиту вступить в реакцию с ионами водорода силанольных групп на поверхности. Чаще всего с этой целью используют триэтиламин в концентрации от 10 до 100 мМ.

В-третьих, можно приобрести специальную колонку, деактивированную основанием. Такие колонки готовят из специально обработанного силикагеля, как правило, с высокой степенью покрытия остаточных групп, что предотвращает взаимодействие аналита с остаточными силанольными группами. Другой вариант деактивации – образование в колонке полимерного покрытия (колонки «Deltabond®»).

Наконец, можно использовать для набивки колонки материал, отличный от окиси кремния, – полистирол, сополимеры полистирола, пористый графитированный углерод, окись циркония. При этом следует иметь в виду, что смена сорбента может стать источником других ошибок.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 12. **Перегрузка колонки**. Если пики слишком велики, не исключена перегрузка колонки. Возможны два варианта перегрузки: по массе и по объёму. Что такое перегрузка по массе, ясно из самого названия: концентрация аналита в пробе слишком велика, желаемое равновесное состояние адсорбции нарушается. В результате время удерживания изменяется, пик искажается. Перегрузка по объёму – явление, сход-

ное с описанными в разделе 1.4 при рассмотрении несовместимости растворителей. В данном случае, однако, нарушения растворимости обусловлены самим аналитом или другими составляющими пробы. Проявляется это обычно как искажение формы пика.

УСТРАНЕНИЕ. Прежде всего, нужно определить, какой из видов перегрузки имеет место. Перегрузку по массе обычно легко устранить простым разбавлением пробы. С этой целью можно либо действительно разбавить пробу перед вводом, либо ввести меньший объём пробы. При этом форма пика улучшается, нормальное значение времени удерживания восстанавливается. Обычно верхний предел нагрузки по массе аналитической колонки в случае низкомолекулярных аналитов составляет около 100 мкг/мл. Если аналит содержится в пробе в малом количестве, а перегрузку вызывают компоненты матрицы, необходимо продумать более специфический вариант детектирования (например, перейти на другую длину волны, использовать флуоресцентный детектор и пр.). Если это невозможно, следует изменить методику пробоподготовки. Можно, например, применить избирательное экстрагирование, в частности, твердофазное.

Выявить источник перегрузки по объёму сложнее. В подобных случаях стороннее воздействие на определяемые вещества может и отсутствовать. Например, при анализе раствора стандартного вещества его пик на хроматограмме не искажается, а при анализе пробы искажается. Причиной ошибки может быть то, что пробу и стандарт готовят в разных растворителях, либо то, что проба содержит компоненты, отсутствующие в растворе стандарта.

Примером первого рода может быть случай, когда пробу готовят в растворителе, более сильном, чем подвижная фаза, либо в растворителе с существенно иным составом модификатора (например, с существенно иными значениями pH или концентрацией буфера). Когда после ввода в хроматограф проба разбавляется подвижной фазой, растворимость аналита может резко упасть. В результате изотерма адсорбции и равновесное состояние распределения будут постоянно меняться, по мере прохождения зоны пробы по колонке. На хроматограмме будут наблюдаться появление «хвоста» пика или множественные пики. Проще всего устранить этот недостаток можно, если использовать другой растворитель для пробоподготовки (или другую подвижную фазу), чтобы свести к минимуму или вообще устранить различия между ними.

Ошибку второго рода устранить гораздо труднее. Здесь компонент пробы изменяет характеристики колонки, таким образом, влияя на распределение аналита. Такой случай встречается чаще всего при анализе лекарствен-

ных и косметических средств, в которых активное вещество (аналит) присутствует в значительно меньших количествах, чем вещества матрицы. Например, ретинолацетат в количестве 0,1 % содержится в креме, состоящем более, чем на 20 % из гликолей. Гликоли вызовут изменение параметров сорбента, вследствие чего условия хроматографического разделения ретинолацетата изменятся. Задача при этом усложняется тем, что допустимые пределы отклонения содержания гликолей могут быть на уровне 1 %. Такое отклонение может заметно сказаться на поведении всей хроматографической системы. Воспроизводимость может быть утрачена. В подобных случаях единственный способ избежать ошибок – перейти на иную методику пробоподготовки.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ К 13. **Низкая эффективность при переводе анализа на тонкие колонки или микроколонки**.

УСТРАНЕНИЕ. *Тонкие колонки*. Тонкие колонки (по определению, с внутренним диаметром менее 3,0 мм, чаще 2,0 мм) имеют множество существенных преимуществ по сравнению с обычными аналитическими колонками (внутренним диаметром > 3,9 мм). Во-первых, они потребляют на 50-60 % меньше элюента, чем аналитические. Соответственно, меньше затраты на приобретение новых растворителей и утилизацию отработанного. Во-вторых, такие колонки предпочтительнее для большинства масс-спектрометрических детекторов, поскольку расход в этом случае составляет зачастую менее 0,3 мл/мин. В-третьих, поскольку потребляется гораздо меньше элюента, можно (опять-таки, по экономическим соображениям) использовать менее распространённые подвижные фазы. В-четвёртых, нужны гораздо меньшие объёмы проб. Последнее особенно важно, если доступное количество материала пробы ограничено. В-пятых, чувствительность и пределы обнаружения системы в целом улучшаются в два-пять раз, поскольку сводятся к минимуму явления, приводящие к размытию хроматографической зоны.

Некоторые параметры, которые следует учитывать и при работе с аналитическими колонками, при работе с тонкими колонками приобретают крайне важное значение. Например, типичный для аналитической работы объём пробы, не менее 5 мкл, для тонких колонок уже не оптимален. Здесь, как правило, нужно вводить не более 2 мкл. Для этого используют специальные или модифицированные инжекторы. Внутренний диаметр и длина соединительных трубок должны быть как можно меньше (см. далее НС Т1), поскольку объём самой тонкой колонки составляет всего несколько сот микролитров. Все соединения и сочленения должны быть очень точными и не иметь течей; накидные гайки с обжимными втулками применять не следует, зазоры между трубкой и муфтой недопустимы. Наконец, сущест-

венное значение приобретает объём детектора. С аналитическими колонками хорошо работают детекторы объёмом 20 мкл и более, но для работы с тонкими колонками рекомендуется использовать детекторы с общим объёмом не более 10 мкл. Соответствующие кюветы специально для тонких колонок выпускаются серийно.

Для набивки тонких колонок зачастую используют силикагель с малым размером зерна, как правило не более 5 мкм. Вследствие этого эффективность разделения повышается, но возрастает и перепад давления в системе. Впрочем, поскольку рабочие значения скоростей потоков довольно малы, перепад давления обычно не выходит за пределы, типичные для насосов для ВЭЖХ. Если используются сорбенты с меньшим размером зерна, нужны и входная и выходная фритты с меньшим размером пор. При набивке с размером зерна 5 мкм и более используют фритты пористостью 2 мкм, а при меньших размерах зерна – 0,5 мкм. Меньшие размеры пор, а также примерно четырёхкратное уменьшение площади поверхности фритты при меньшем внутреннем диаметре колонки, приводят к тому, что колонка чаще засоряется. Большее внимание нужно обращать и на осаждение сторонних веществ на фриттах. При работе с тонкими колонками необходимо часто и регулярно выполнять обратную промывку.

Микроколонки. Микроколонки имеют весьма высокую эффективность. Обычно их длина – около 25 см. Набивка имеет размер зерна в широких пределах, чаще всего 3 и 5 мкм. Потребление элюента составляет обычно не более 10 % от сопоставимой аналитической колонки. Благодаря малым объёмам, такие колонки обеспечивают анализы отличающиеся самой высокой чувствительностью и особенно хорошо подходят, когда количество материала пробы ограничено. Их также особенно хорошо использовать для сочетания ЖХ-МС.

При использовании микроколонок приобретает особую важность вопрос сведения к минимуму внеколоночных объёмов. Объём вводимой пробы должен составлять до 1 мкл, требуются также проточные кюветы детекторов объёмом не более 3 мкл. Соединительные трубки должны иметь как можно меньшие значения внутреннего диаметра и длины. Качество соединений должно быть безукоризненными, поскольку любой зазор приводит к серьёзным нарушениям работы. Ряд сочетаний типов насосов и детекторов не соответствует столь строгим требованиям, поскольку расстояние от выхода инжектора до детектора оказывается слишком велико.

Кроме требований по объёму, нужно выдерживать малые значения расхода, обычно не более 100 мкл/мин, с достаточной степенью точности. Чтобы столь малый расход был постоянным, нужны специальные головки

насосов, предназначенные для подачи на скоростях, требуемых для микроколонок. На таких колонках перепад давления также мог бы быть большим, но и здесь это компенсируется малым расходом.

Особое внимание нужно также обратить на удаление микрочастиц из растворителя, используемого для пробоподготовки. Поскольку площадь входной фритты в таких системах в 10 и более раз меньше, чем фритты аналитической колонки, их засорение превращается в серьёзный вопрос. Необходимо запланировать регулярную промывку колонки как безобращения, так и с обращением потока. Обязательно удалять растворители, содержащие соли, поскольку высаливание на фритте будет иметь катастрофические последствия.

Несмотря на то, что применение колонок малого диаметра и микроколонок выгодно экономически и удобно для анализа, многие лаборатории не стремятся на них переходить. Причина даже не в том, что возрастает вероятность ошибок при работе, а в том, что переработка и повторная валидация методик – слишком дорогостоящий процесс.

3.10 СОЕДИНИТЕЛЬНЫЕ ТРУБКИ

В системах ВЭЖХ используются соединительные капилляры главным образом трёх типов: низкого давления и большого диаметра, высокого давления и большого диаметра, а также высокого давления малого диаметра. Независимо от конструкции соединительных элементов, трубки должны быть аккуратно отрезаны под прямым углом к оси. Заусенцы и неровности должны быть удалены. Просвет трубки должен быть полностью открыт. До монтажа в систему ВЭЖХ каждый отрезок соединительной трубки должен быть промыт подвижной фазой, чтобы удалить возможно имеющиеся там микрочастицы и осаждённые на стенках загрязнения.

Трубки из ПТФЭ легко режутся лезвием бритвы, а для резки нержавеющей стали и ПЭЭК рекомендуется приобрести специальный инструмент. Можно также приобрести набор готовых трубок, нарезанных на нужную длину в заводских условиях, хотя такой вариант оставляет меньшую свободу манёвра.

Ещё одна нетривиальная и очень важная операция – сочленение трубки с муфтой. Если используются накидные гайки и обжимные втулки (ферулы), необходимо надеть гайку и ферулу на капилляр (фаска на обжимной втулке должна быть обращена в сторону гайки), затем вставить трубку в муфту до упора. Удерживая ферулу и капилляр неподвижно друг относительно друга в процессе навинчивания накидной гайки, необходимо затя-

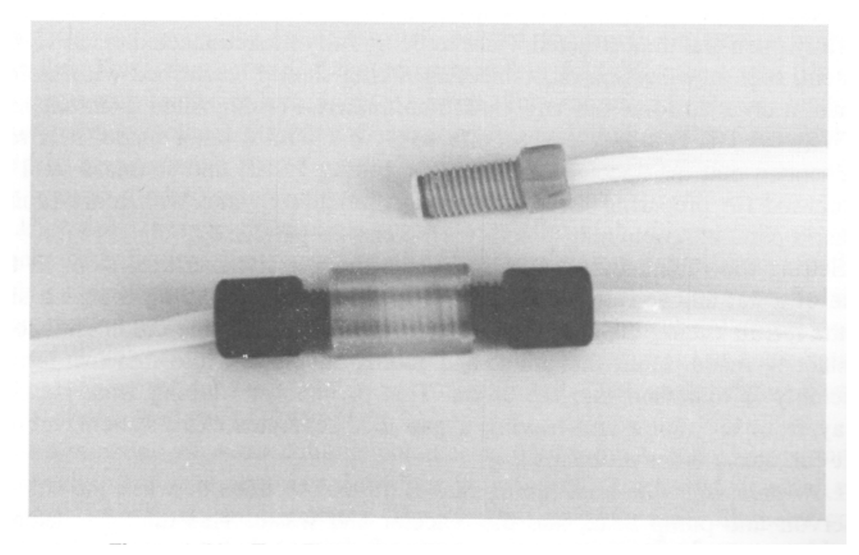


Рис. 3.41. *Вверху*: фитинг из ПТФЭ с фланцем. *Внизу*: пластмассовая муфта.

нуть гайку. Благодаря этому, трубка не отодвинется назад, и между её торцом и ферулой не образуется зазор, увеличивающий общий объём системы и являющийся возможным источником ошибок.

Соединения между резервуаром с растворителем и насосом, а также между детектором и ёмкостью для отработанной подвижной фазы выполняют с помощью трубок низкого давления и большого диаметра. Эти трубки обычно изготовлены из ПТФЭ. Они крепятся чаще всего с помощью фланца и резьбы или просто надеваются на патрубок (рис. 3.41). Соединения выполняются так, чтобы не препятствовать свободному прохождению растворителя на входе или отработанной подвижной фазы на выходе.

Трубки высокого давления большого диаметра используются в соединениях между головкой насоса и инжектором. Такие трубки должны выдерживать до 40 МПа (6000 фс/дюйм^2) – наибольшее допустимое рабочее давление в современных системах для ВЭЖХ. Внутренний диаметр в данном случае не играет большой роли, но следует иметь в виду, что в градиентном режиме весь внутренний объём должен быть пройден, прежде чем изменение состава дойдёт до колонки. Соответствующее время называют *холостым*. С другой стороны, трубки слишком малого диаметра использовать также не целесообразно, поскольку они чаще забиваются. Оптимальный вариант применять трубки диаметром около 0,5 мм (0,02 дюйма). В этом

случае соединения выполняются накидными гайками с ферулой или фитингами, завинчиваемыми вручную.

Трубки высокого давления и малого диаметра используются во всех соединениях от инжектора до детектора. Обычно их внутренний диаметр составляет около 0,18 мм (0,007 дюйма). Изготавливают их из нержавеющей стали, ПЭЭК и титана. При этом крайне важно, чтобы трубки были отрезаны под прямым углом к оси, а соединения оставались плотными и не имели течей. Длина соединительных трубок должна быть как можно меньше, чтобы свести к минимуму внеколоночный объём. Необходимо помнить, что чем больше внеколоночный объём, тем ниже общая эффективность системы.

Соединительные капилляры изготавливают из разных материалов для того, чтобы можно было их подобрать по критерию совместимости с аналитом. Для подавляющего большинства аналитов лучшим материалом является нержавеющая сталь. Она не реагирует с очень широким спектром органических растворителей, равно как и неорганическими буферами и растворами солей. Трубки из нержавеющей стали стоят недорого, выпускаются множеством производителей в широком спектре внутренних диаметров и выдерживают очень высокие давления.

Вопрос о совместимости материала капилляров с пробой возникает при анализе пептидов, белков и неорганических ионов. В этих случаях используют трубки, соответственно, из титана и ПЭЭК. Титан стоит дороже, ПЭЭК совместим с рядом органических растворителей. Из обоих этих материалов изготавливают также заготовки колонок.

Для замены нужно иметь отрезок капилляра соответствующей длины. В большинстве случаев такие отрезки можно приобрести готовыми. Они отрезаны строго перпендикулярно оси, с торцов сняты заусенцы, удалены остатки материала, попавшие при отрезке внутрь трубки. В продаже имеются отрезки длиной 5, 10, 20 и 30 см. Это – самый простой и воспроизводимый способ замены. Промышленностью выпускаются также недорогие наборы трубок разных длин и внутренних диаметров.

В условиях лаборатории имеются три распространённых способа резки трубок из нержавеющей стали. Один – специальная машинка с режущим роликом. Трубку зажимают в поворотном приспособлении и подают на ролик. По окончании отрезки удаляют заусенцы специальным комплектным приспособлением.

Во втором способе используется труборез (рис. 3.42 А). Трубку помещают в труборез между режущим роликом и упором. Затем труборез вручную проворачивают вокруг трубки. После того, как по всей

окружности нанесена риска, ролик прижимают к трубке, снова проворачивают труборез, и так до тех пор, пока трубка не будет перерезана. В этом случае вокруг места надреза часто образуется «манжетка», которую нужно аккуратно снять напильником. При этом нужно убедиться в том, что надрез перпендикулярен оси, а внутри нет заусенцев. В процессе реза трубка может выпучиваться наружу по линии отреза. В этом случае её часть придётся обработать напильником снаружи, чтобы она вошла в накидную гайку и обжимную втулку.

Третий способ – нанести на трубку риску и переломить её. В этом случае по линии отреза на нужной длине наносят риску острым ребром напильника. Затем по обе стороны от риски трубку захватывают плоскогубцами и перегибают поочерёдно в разные стороны. При изломе трубка часто изгибается, а торец получается неровным. Заравнивают и заглаживают торец напильником.

Трубки из ПЭЭК (и ПТФЭ) обычно можно перерезать острым лезвием. Главное – «пилить» трубку возвратно-поступательным движениями, как режут ножом хлеб. При этом не прилагать избыточных усилий, чтобы прорезать трубку, потому что её легко деформировать. Промышленность выпускает также специальные приспособления для резки пластмассовых трубок (рис. 3.42 Б).

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Т 1. **Снижение эффективности системы после замены трубки**.

УСТРАНЕНИЕ. В части системы ВЭЖХ под высоким давлением трубки нуждаются в периодической замене. Для замены используйте трубки из того же материала и тех же длины и диаметра. Чтобы упростить задачу хроматографисту, многие изготовители используют цветовое кодирование отрезков трубок заводского изготовления в соответствии с внутренним диаметром.

Зависимость объёма, который трубка привносит в систему, от её длины и внутреннего диаметра выглядит так:

$$V\,(\text{мл}) = \pi r^2 L,$$

где π равно примерно 3,1416, r – внутренний радиус в сантиметрах, L – длина в сантиметрах (см. табл. 3.4). Эту зависимость можно преобразовать к виду:

$$V\,(\text{мкл/см}) = 1000\pi\,(0{,}05d)^2,$$

где 1000 – коэффициент преобразования миллилитров в микролитры, d – внутренний диаметр в миллиметрах, 0,05 – коэффициент преобразования

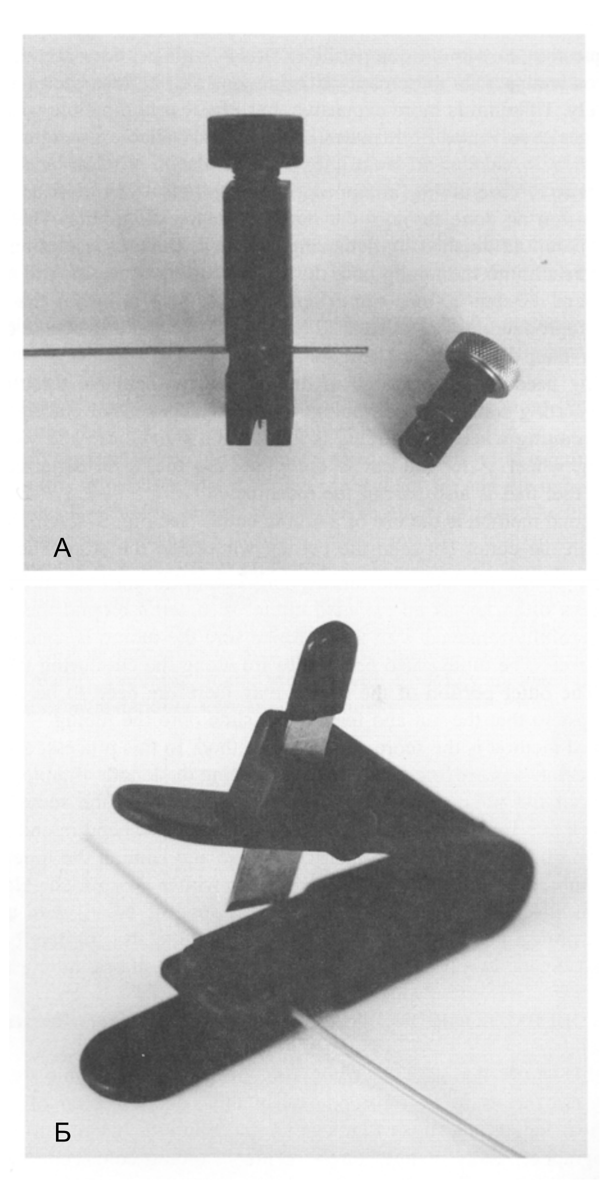


Рис. 3.42. (А) *Справа*: труборез для нержавеющей стали; *слева*: приспособление для снятия заусенцев. (Б) Приспособление для резки трубок из ПЭЭК.

миллиметров в сантиметры и диаметра в радиус (если в документации диаметр указан в дюймах, вместо коэффициента 0,05 нужно подставить 1,27); при этом $L = 1$ см. Соответственно, каждый сантиметр трубки внутренним диаметром 0,254 мм (0,01 дюйма) вносит в систему дополнительно объём

$$V = 1000 \times 3{,}1416 \times (0{,}25 \times 0{,}05)^2 = 0{,}507 \text{ мкл.}$$

Помимо диаметра и длины, важную роль играет обработка торцов трубки. Если трубка обрезана строго перпендикулярно оси, её торец будет плотно прилегать к муфте, соединение не будет протекать. Если нет – в соединении с большой вероятностью будет течь. Это, впрочем, не так страшно, поскольку соединение можно исправить до ввода системы в эксплуатацию. Гораздо хуже, если в самой муфте имеется перекос (см. рис. 3.43 А, Б). В подобных случаях возникают внеколоночные полости, которые плохо промываются подвижной фазой. Это может привести к сильному удлинению среза пиков или двоению пиков.

Если нет веских доводов против этого, лучше иметь запас заводских отрезков трубок разной длины с хорошо обработанными торцами. Стоимость такого набора не идёт ни в какое сравнение с затратами, сопряжёнными с ошибками и осложнениями, которых он помогает избежать. Следует также помнить, что большие внеколоночные объёмы привносят муфты с внутренней резьбой с обоих концов. Чтобы свести к минимуму объём, привносимый в систему соединениями, по возможности следует использовать муфты с «нулевым» мёртвым объёмом.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Т 2. **Течи в соединениях трубопроводов низкого давления**.

УСТРАНЕНИЕ. Трубопроводы низкого давления точно так же требуют периодической замены, как и высокого давления. В этих случаях чаще всего используют трубки из ПТФЭ. Сочленения в трубопроводах низкого давления обычно выполняют одним из следующих трёх способов:

1. Трубку из ПТФЭ насаживают на патрубок.
2. Трубка из ПТФЭ оснащена ферулой и накидной гайкой, которую навинчивают на муфту.
3. На трубке из ПТФЭ имеется фланец и специальная пластмассовая гайка под фитинг.

Если соединение первого типа используется на входном фильтре, через него могут проходить микрочастицы. Если оно используется на выходе детектора для отвода отработанной подвижной фазы в соответствующую ёмкость, подвижная фаза может протекать на лабораторный стол. В обоих

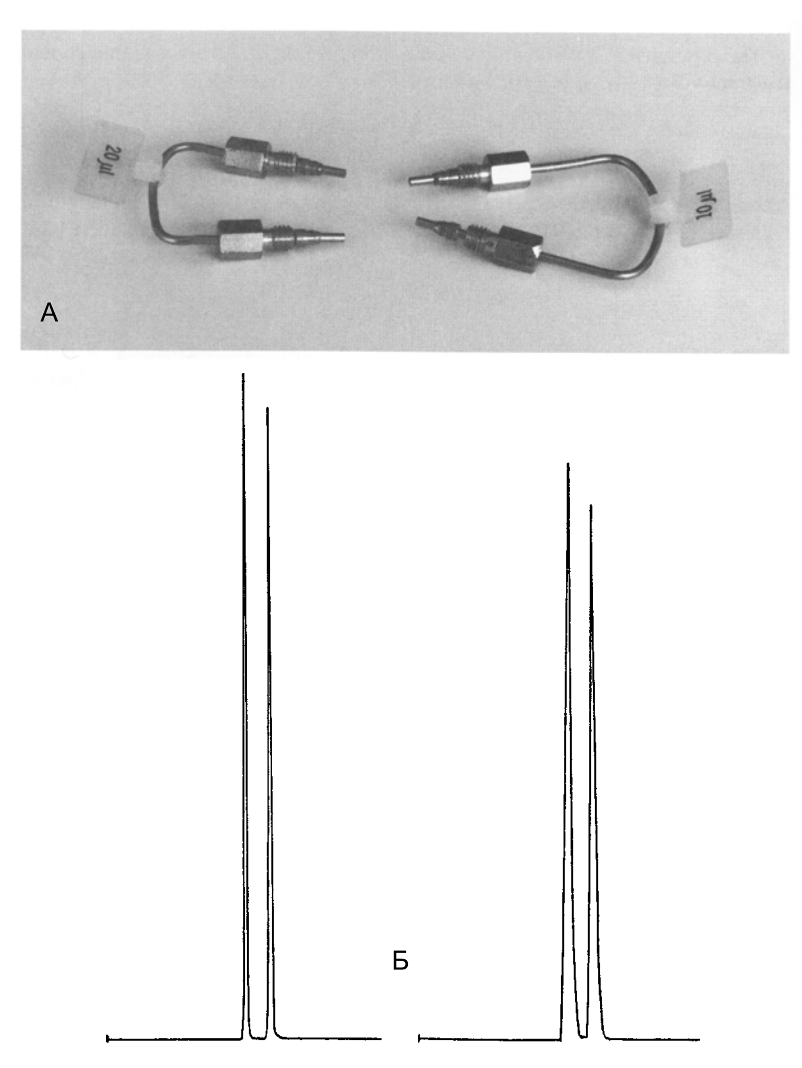


Рис. 3.43. (А) Две петли инжектора. Слева обжимные втулки находятся на надлежащем расстоянии. Справа нижняя обжимная втулка надета слишком близко. При этом возрастает внеколоночный объём и образуется полость в сочленении. (Б) Хроматограмма слева соответствует оптимальному выбору внутреннего диаметра и длины трубки и правильному соединению. Хроматограмма справа иллюстрирует влияние некачественных соединений трубопроводов на форму хроматографических пиков. Аналогичным образом проявляется ошибка при неверном выборе соединительных трубок (слишком большой внутренний диаметр или слишком длинный отрезок).

случаях с помощью лезвия следует укоротить трубку примерно на 2,5 см и присоединить повторно. Необходимо обратить внимание на то, что в некоторых случаях трубка надевается слишком туго. Чтобы облегчить сочленение, следует смочить патрубок изопропиловым спиртом.

Соединение второго типа гораздо устойчивее к внешним воздействиям и долговечнее. Герметичность соединения достигается за счёт того, что обжимное кольцо сжимается между муфтой и накидной гайкой. При замене необходимо укоротить трубку примерно на 2,5 см, заменить обжимное кольцо и повторно собрать соединение, завинтив накидную гайку.

В случае фланцевого соединения труднее всего заменить фланец на трубке. Необходимо обратить внимание на то, что гайку и шайбу нужно надеть на трубку *перед тем*, как изготовить фланец. И фланец, и муфта должны иметь поверхности, перпендикулярные оси. Правильное соединение имеет место, когда трубка доходит до упора в муфте, в противном случае в муфте будет иметься большой трудно промываемый объём.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Т 3. **Под высоким давлением протекает сочленение трубки с муфтой**.

УСТРАНЕНИЕ. При замене трубки следует обязательно записать внутренний диаметр ранее использованной трубки, а также типы гайки и обжимного кольца. Последствия неверного подбора диаметра изложены выше. Выбор гайки и обжимного кольца важен, поскольку у разных фирм-изготовителей этот узел имеет разные основные размеры. Чтобы трубка правильно сочленялась с муфтой, она должна точно и до упора входить во внутреннюю торцовую поверхность в полость муфты. Обжимное кольцо окончательно поджимает трубку к муфте и обеспечивает герметичность соединения.

Чтобы правильно выполнить сочленение, трубку вставляют до упора в муфту и вручную ввинчивают гайку в муфту. Этим предотвращается выскальзывание трубки при дальнейшем затягивании. С помощью гаечных ключей муфту удерживают и затягивают гайку до тех пор, пока не почувствуется заметное сопротивление затягиванию.

Если накидное кольцо выбрано неправильно, фаски на нём и муфте не соответствуют друг другу, т. е стык не согласован. Зачастую хроматографист об этом не догадывается (поскольку при демонтаже старого отрезка трубки не были записаны типы гайки и обжимного кольца) и продолжает затягивать соединение до тех пор, пока не прекратится течь. Это приводит к холодному свариванию деталей, после чего разделить их уже невозможно. Этого ни в коем случае нельзя допускать, особенно там, где сочленяемые элементы труднозаменяемы и дороги (инжекторы, детекторы).

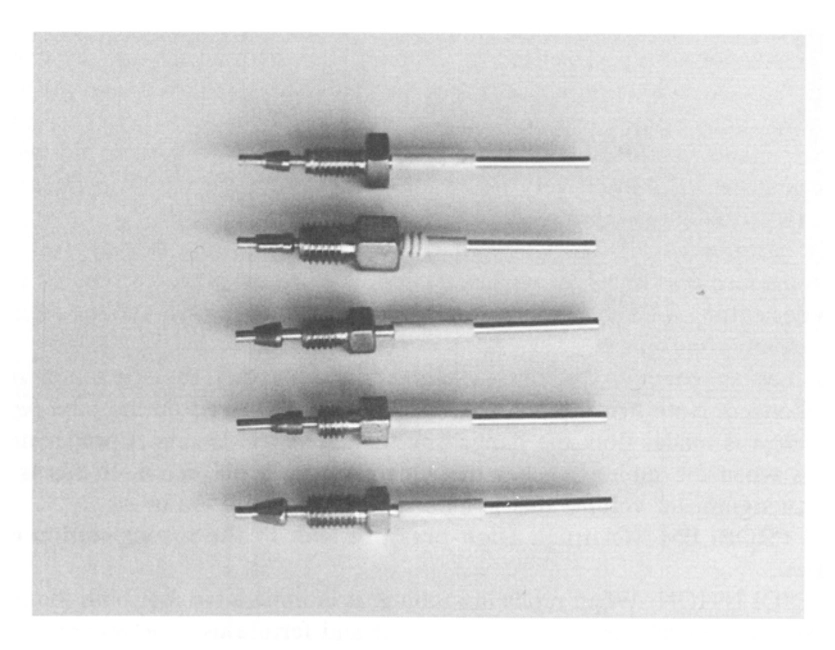


Рис. 3.44. Накидные гайки и обжимные втулки (ферулы). Установленные обжимные втулки (следует обратить внимание на разную глубину). В разобранном виде гайки и обжимные втулки показаны на рис. 1.22.

Промышленность выпускает накидные гайки и ферулы из нержавеющей стали пяти основных конструкций. Эти конструкции называют по фирмам-изготовителям (рис. 3.44) – Уотерс, Свэджелок, Паркер, Валко и Реодайн. Соответствующие сочленения выдерживают очень большие давления (свыше 40 МПа или 6000 фс/дюйм^2) и в ряде случаев допускает повторное использование. Рекомендуется иметь в лаборатории шесть комплектов каждого типа.

Кроме соединений из нержавеющей стали, в настоящее время выпускаются пластмассовые соединители – цельные и двухкомпонентные (см. рис. 1.23). Их используют вместо стальных и затягивают вручную. Преимущество пластмассовых изделий состоит в том, что пластмасса деформируется, принимая форму внутренней полости муфты, допускает многократное использование и не требует применения инструментов для монтажа. Недостаток – в том, что нитки резьбы могут быть срезаны и попасть в трубопровод и поток подвижной фазы. Рекомендуется также иметь в лаборатории по шесть пластмассовых фитингов каждого типа.

3.11 ДЕТЕКТОРЫ

Детектор – последний элемент системы ВЭЖХ. Из всего многообразия применяемых в настоящее время детекторов здесь рассматриваются три: спектрофотометр ультрафиолетового и видимого диапазонов, рефрактометр и флуориметрический детектор. Несмотря на принципиальные различия этих детекторов, при их использовании имеются сходные источники и, соответственно, пути предупреждения возможных ошибок. Они рассмотрены в разделе 3.11.Г. Вопросы, касающиеся только одного из указанных детекторов, изложены в разделах 3.11.А – 3.11.В.

3.11.А Спектрофотометрические детекторы ультрафиолетового и видимого диапазонов (УФВ)

Принцип действия детектора УФВ состоит в измерении разности интенсивностей падающего пучка светового излучения и того же пучка, ослабленного в соответствии с концентрацией и коэффициентом поглощения аналита. Основная зависимость описывается законом Бэра: $A = \varepsilon bc$, где A – поглощение; ε – коэффициент поглощения аналита, b – длина оптического пути пучка излучения в кювете детектора; c – концентрация аналита в кювете.

Существуют две основных конструкции детектора УФВ: с фиксированной (или перестраиваемой) длиной волны и диодно-матричный. Схемы обеих конструкций представлены на рис. 3.45. Источником излучения служит высокоинтенсивная дейтериевая лампа для УФ диапазона или лампа накаливания для видимого диапазона – одинаково для обеих конструкций. Далее в детекторе с фиксированной длиной волны за источником располагается монохроматор – устройство, пропускающее на кювету излучение только заданной длины волны. При этом интенсивность излучения, естественно, уменьшается, поскольку на кювету попадает лишь небольшая часть первоначального потока. Перед проточной кюветой и после неё имеются коллиматор и фокусирующая линза, чтобы как можно большая часть излучения проходила сквозь кювету. Разрешение на данной длине волны и селективность детектора определяются характеристиками монохроматора. Дополнительно разрешением и селективностью можно управлять, если поместить ещё один монохроматор после кюветы.

Принцип действия детектора УФВ состоит в измерении разности интенсивностей сигнала от источника и сигнала после прохождения пучка излучения сквозь проточную кювету. Ослабление сигнала определяется концентрацией аналита и молярным коэффициентом поглощения аналита ε на данной длине волны.

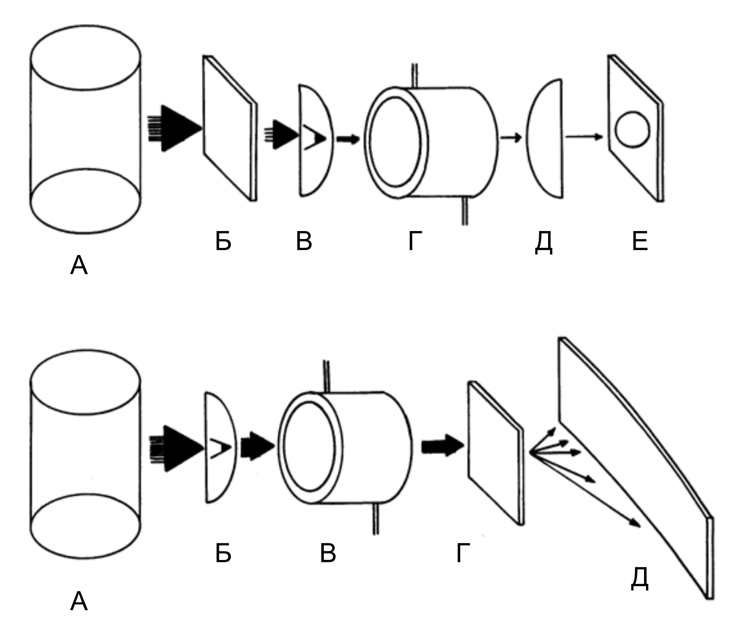


Рис. 3.45. *Вверху*. Схема детектора УФВ с фиксированной длиной волны: А – источник; Б – монохроматор; В – фокусирующая линза; Г – проточная кювета; Д – фокусирующая линза; Е – фотодиод.
Внизу. Схема диодно-матричного детектора: А – источник; Б – фокусирующий элемент; В – проточная кювета; Г – диспергирующий элемент (чаще всего дифракционная решётка); Д – матрица фотодиодов. Преимущество диодно-матричного детектора в том, что он работает с полным спектром, при этом сквозь кювету проходит весь поток излучения.

Чтобы определить поглощение, измеренную интенсивность падающего пучка излучения нужно сравнить с интенсивностью этого же пучка после прохождения сквозь кювету. Слабое поглощение аналитов, присутствующих в малой концентрации, даёт лишь незначительное изменение интенсивности. Соответственно, погрешность измерения небольшой разности двух больших значений велика. Если аналиты содержатся в большой концентрации или сильно поглощают, это также приводит к значительным ошибкам. Участок кривой поглощения, на котором погрешность измерения имеет наименьшее значение, обычно лежит в пределах $0,1 < A < 0,7$. Это соответствует изменению концентрации примерно на порядок. Именно для таких концентраций и могут быть получены наилучшие результаты (на данном конкретном детекторе). Рабочий диапазон концентраций зависит от параметра b аналита, объёма вводимой пробы, длины оптического пути кюветы и пр.

В общем виде, процесс получения пика хроматограммы с помощью детектора УФВ начинается с определения фонового сигнала в системе. Если

кювета заполнена подвижной фазой, через неё проходит поток излучения неизменной интенсивности, система регистрации выдаёт нулевую линию. Как только через кювету начинает проходить подвижная фаза, где содержится аналит, поглощающий излучение, интенсивность излучения, прошедшего сквозь кювету, уменьшается. Измеряемое при этом значение поглощения *A* возрастает до тех пор, пока не будет достигнута наибольшая концентрация аналита. Затем значение поглощения уменьшается по мере выхода аналита из кюветы детектора, пока сигнал не возвращается к нулевой линии. Это – знакомый всем пик хроматограммы.

Как уже было сказано, детекторы УФВ имеют две основные конструкции – с фиксированной длиной волны и с матрицей фотодиодов (МФД; его также называют диодно-матричным детектором – ДМД). В детекторе с фиксированной длиной волны имеется последовательность линз и щелей, с помощью которых пучок излучения от источника вначале фокусируется на кювете, а затем пучок, прошедший сквозь кювету, фокусируется на фотодиоде. Спектральное разрешение достигается за счёт характеристик монохроматоров и фильтров. После источника имеется монохроматор, который выбирает небольшой участок спектра источника. Именно на этом участке находится длина волны, на которой наблюдается разделение анализируемых веществ. Очень важно правильно выбрать рабочую длину волны, поскольку детектор обнаруживает только аналиты с ненулевым значением ε. Монохроматор, помещенный после кюветы, отсекает рассеянное излучение и другие спектральные помехи детектора и других элементов системы.

Главный недостаток детектора с фиксированной длиной волны в том, что бóльшая часть излучения отсекается от кюветы, поскольку выбирается только одна длина волны в диапазоне 200 – 350 нм. Во-вторых, поскольку детектирование осуществляется только на одной длине волны, спектральная информация об аналите в основном оказывается утерянной. К преимуществам детектора с фиксированной длиной волны относятся простота эксплуатации, сравнительно низкая стоимость и малые затраты на техническое обслуживание.

Принцип действия ДМД такой же, за исключением того, что монохроматор до проточной кюветы не используется. При этом весь пучок излучения от источника фокусируется на кювете детектора. Прошедший сквозь кювету пучок излучения развёртывается в спектр по длинам волн (например, с помощью призмы или дифракционной решетки). Вдоль дуги спектра расположены фотодиоды определённой ширины. Каждый из диодов, в соответствии с геометрическими размерами, расстоянием от призмы, угловым расположением по отношению к призме и диспергирующей силой призмы, принимает сигнал с определённого участка спектра излучения. Спектральное разреше-

ние детектора определяется совокупностью указанных параметров. Наиболее распространены значения спектрального разрешения 4 нм, 2 нм и 1 нм.

ДМД – мощное средство анализа. Такие детекторы не только прекрасно подходят для количественного анализа, с их помощью можно построить спектральную характеристику, т.е. зависимость A от λ для каждого из аналитов. Это позволяет идентифицировать аналиты независимо от времени удерживания. Итак, основным преимуществом детектора с матрицей фотодиодов является возможность получения информации, причём в большом количестве. Когда-то к недостаткам ДМД относили то, что для обработки этой информации нужен компьютер; сейчас это не более, чем просто одно из требований. Компьютер должен быть оснащён средствами быстрого сбора данных, иметь большую ёмкость накопителя и программное обеспечение для работы с большими объёмами данных. Такие компьютеры и программы в настоящее время выпускаются в больших количествах и по сравнительно низким ценам. Основной недостаток ДМД заключается не в самом детекторе, поскольку его эксплуатация и техническое обслуживание лишь незначительно сложнее, чем детектора с фиксированной длиной волны, а в том, что в

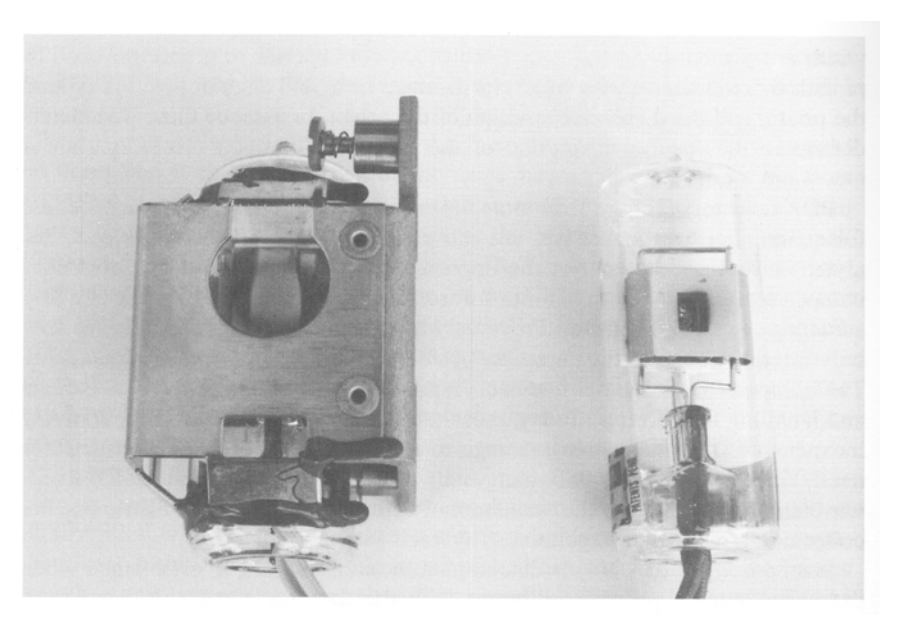


Рис. 3.46. Источники УФ излучения. *Слева*: отъюстированный и смонтированный в креплении. *Справа*: смонтированный с возможностью перемещения.

каждом опыте получают большое количество информации, которая оказывается в основном бесполезной.

Для обеих конструкций УФВ детекторов нулевая линия устанавливается, когда подвижная фаза уравновешивается с детектором. После этого включается функция автоматической установки на нуль, принудительно поддерживающая нулевые показания детектора. Следует помнить, что, если подвижная фаза имеет заметный коэффициент поглощения, функция автоматической установки на нуль не устраняет его, а просто обнуляет показания.

Этот простой факт объясняет появление системных пиков. Действительно, если бы коэффициент поглощения подвижной фазы был нулевым, чтобы получить отрицательный пик, раствор должен был бы излучать. Если же подвижная фаза поглощает излучение, отрицательный пик будет получен, когда аналит поглощает *меньше*, чем подвижная фаза. Стремление получить как можно меньший фоновый сигнал поглощения побуждает применять растворители как можно более высокой чистоты для приготовления подвижной фазы и работать в диапазоне длин волн, как можно более удалённом от предела пропускания растворителей в УФ диапазоне.

Источники излучения в детекторах УФВ либо смонтированы неподвижно так, чтобы оптимизировать выходной сигнал, либо допускают юстировку с этой же целью (рис. 3.46). Необходимо знать, что поток излучения источника очень точно фокусируется, поэтому юстировка источника крайне необходима для обеспечения приемлемых рабочих параметров.

3.11.Б Рефрактометрические детекторы

Рефрактометрические детекторы начали применяться в ВЭЖХ одними из первых. Хотя в разное время выпускались детекторы четырёх принципиально разных типов, сейчас на рынке детекторов для ВЭЖХ преобладают два: с отклонением луча и с линзой Френеля. Первые более распространены, и здесь мы ограничимся рассмотрением только их.

Принцип действия рефрактометрического детектора заключается в том, что свет на границе стекла, из которого изготовлена проточная кювета, и жидкости, заключённой в ней, отклоняется за счёт преломления. Степень этого отклонения зависит от коэффициента преломления n раствора и тангенса внутреннего угла α кюветы (рис. 3.47). Следует обратить внимание на то, что детектор содержит две кюветы: рабочую и эталонную. Рабочая кювета – та, через которую проходит элюат ВЭЖХ. Эталонную обычно уравновешивают с подвижной фазой до начала анализа. Для этой цели

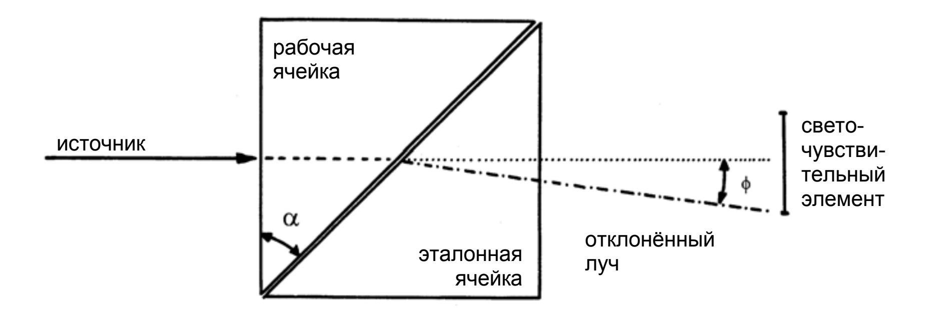


Рис. 3.47. Рефрактометрические кюветы в детекторе с отклонением луча. Излучение от источника проходит сквозь рабочую ячейку, затем через эталонную ячейку. Состав раствора в эталонной ячейке неизменен, как правило, там находится подвижная фаза. Когда через рабочую ячейку проходит чистая подвижная фаза, луч на выходе не отклоняется (пунктирная линия), поскольку показатели преломления обоих растворов одинаковы. Когда через кювету проходит аналит, луч отклоняется на угол φ (штрих-пунктирная линия). При этом интенсивность облучения светочувствительного элемента меняется, записывается пик хроматограммы.

используется промывочный клапан, направляющий поток подвижной фазы в эталонную кювету.

Когда система уравновешена, излучение проходит сквозь кювету детектора и попадает на двухкомпонентный фотодиод. Систему балансируют (добиваются нулевого сигнала на выходе), добиваясь уравнивания излучения на обоих компонентах диода за счёт небольших изменений в оптической части. Для этой цели используется функция балансировки (или рукоятка на автономных детекторах).

Изменение сигнала детектора следует из закона Снелля

$$\varphi = (n_1 - n_2)\ tg\alpha,$$

где n_1 и n_2 – показатели преломления жидкости, соответственно, в рабочей и эталонной кюветах, α – внутренний угол кюветы. Показатели преломления различных растворителей приведены в таблице 2 Приложения.

При работе с рефрактометрическим детектором важно учитывать, что показатель преломления растворителя сильно зависит от температуры. Из практики известно, что показатель преломления уменьшается примерно на 0,0004 при повышении температуры на один градус Цельсия. Может показаться, что это очень мало, но в действительности достаточно взглянуть на цену деления рефрактометрического детектора (как правило, 1×10^{-5}), чтобы понять, что такое изменение заметно скажется на сигнале детектора. Во всех рефрактометрических детекторах кюветы подогреваются, температура их поддерживается постоянной. К тому же, при работе с рефрактометричес-

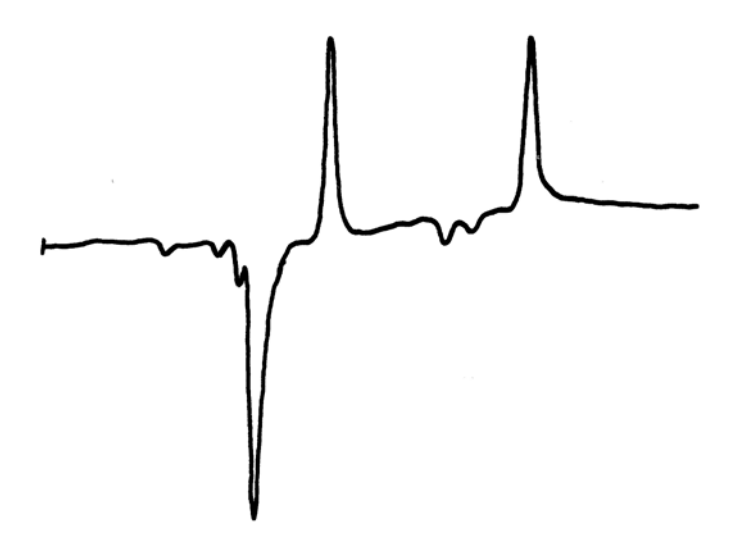


Рис. 3.48. Положительные и отрицательные пики и изменения интенсивности на полученной на рефрактометрическом детекторе хроматограмме сложной смеси жирной кислоты, холестерина и сфинганина. Положительные и отрицательные пики обусловлены анализируемыми веществами и допускают количественное определение.

ким детектором обязательно следует строго контролировать температуру в системе в целом.

Главным недостатком рефрактометрических детекторов является то, что ими нельзя пользоваться в градиентном режиме. Несмотря на ряд попыток осуществить компенсацию показателя преломления в градиентном режиме, трудности перевешивают возможные положительные стороны.

Ещё одна сложность работы с рефрактометрическим детектором состоит в том, что система обработки данных должна позволять интегрировать как положительные, так и отрицательные пики. Пример такого рода показан на рис. 3.48.

Главное преимущество рефрактометрического детектора в том, что это – единственный недорогой универсальный детектор. Поскольку показатели преломления всех веществ различны, всегда можно подобрать условия работы, при которых интересующее нас вещество будет давать сигнал. Будет ли сигнал достаточно сильным, зависит от показателя преломления соответствующего вещества и пределов обнаружения системы.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 1. **Медленный, но значительный дрейф нулевой линии**.

УСТРАНЕНИЕ. Как уже было сказано, рефрактометр требует постоянства температуры в системе. Чтобы этого добиться, резервуары с растворителями, все соединительные трубопроводы, головка насоса, инжектор, колонка и детектор должны иметь одинаковую температуру. Не следует забывать, что важнейший элемент, не входящий в число элементов хроматографа, т.е. *проба*, должен иметь ту же температуру.

Ещё одним источником возможных ошибок является то, что термостат хроматографа устанавливают на температуру, не слишком отличающуюся от комнатной. Это затрудняет регулирование температуры термостатом. Чтобы этого избежать, следует задавать температуру в системе, по меньшей мере, на 10°C выше, чем температура окружающей среды.

Следует помнить также, что после запуска рефрактометрического детектора должны достичь заданной температуры не только проба и проточные кюветы, но и весь элюент в системе. Иногда для этого требуется более часа. В процессе уравновешивания нулевая линия будет постоянно идти вверх или вниз, в зависимости от первоначального состояния системы.

Необходимо всегда применять заранее приготовленную смесь растворителей, которую насос подаёт на производительности 100 % (если в системе установлен градиентный насос). Даже небольших отклонений в составе элюента, смешиваемого насосом, достаточно, чтобы отклик детектора изменился до неузнаваемости.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 2. **Сигнал отсутствует или детектор «зашкаливает»**.

УСТРАНЕНИЕ. «Зашкаливание» детектора обычно обусловлено одной из двух следующих причин. Во-первых, возможно, эталонную кювету не перевели на новый элюент. Случаи несовместимых растворителей и элюентов, содержащих несовместимые буферы, описаны в разделе 2.3, Р4.

Во-вторых, возможно, температура системы далека от требуемой. Нужно убедиться в том, что нагреватель и регулятор температуры включены, а затем выждать, пока система не уравновесится по температуре. После этого следует удостовериться, что эталонная кювета промыта.

Сигнал может отсутствовать из-за того, что лампа не даёт нужной интенсивности света. Замена лампы должна быть предусмотрена в графике регламентных профилактических работ. Обычно наработка лампы до замены составляет 1000 часов (или другой срок, рекомендованный изготовите-

лем). Поскольку лампы ненаправленные, замена их осуществляется легко и быстро.

3.11.В Флуориметрические детекторы

Из трёх описываемых здесь детекторов флуориметрический предпочтителен в терминах пределов обнаружения, специфичности и отношения сигнал-шум. Во флуориметрических детекторах используется система двойного монохроматора, как в детекторах УФВ с фиксированной длиной волны, но здесь падающий и выходящий пучки ориентированы под углом 90° по отношению друг к другу (рис. 3.49). В процессе флуоресценции молекула поглощает коротковолновое излучение, переходит на первый уровень возбуждения, после чего происходит релаксация и испускание на большей, специфической для данной молекулы, длине волны. Испускаемое излучение и воспринимает светочувствительный элемент детектора.

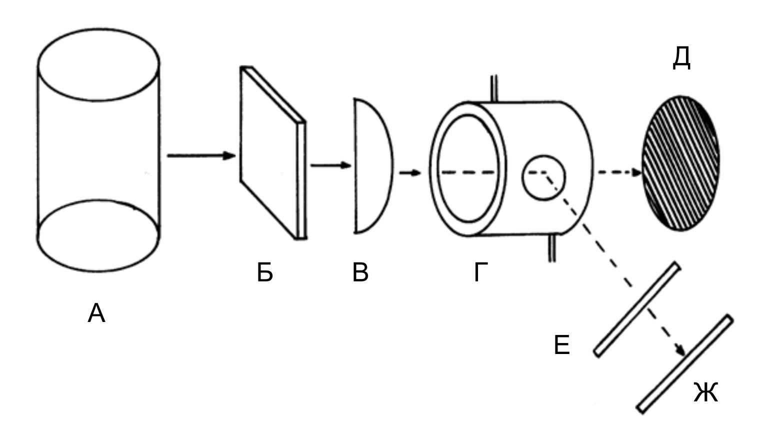


Рис. 3.49. Схема флуориметрического детектора: А – источник; Б – монохроматор или отсекающий фильтр; В– фокусирующая линза; Г – проточная кювета; Д – светоуловитель; Е – монохроматор или полосовой фильтр; Ж – фотодиод. Следует обратить внимание на то, что, поскольку длина волны возбуждения иная (ниже), чем излучения, фоновый сигнал будет равен нулю.

Предел обнаружения флуориметрического детектора обычно ниже на несколько порядков, чем УФ, поскольку измеряемый рабочий сигнал представляет собой разность значения интенсивности излучения и нуля (а не разность двух больших величин). Специфичность достигается путём выбора длин волн как возбуждения (падающего пучка), так и испускания

(молекул аналита). Наконец, фоновый шум обусловлен лишь рассеянным излучением и шумом в электронной схеме, т.е. гораздо ниже, чем в других детекторах.

Недостатки флуориметрических детекторов столь же многочисленны, как и достоинства. Во-первых, и возбуждение, и испускание для данного соединения ограничены довольно узкими диапазонами длин волн. Это не создает трудности само по себе, но в сочетании с тем, что спектр испускания сильно зависит от состава элюента, решение задачи становится далеко не тривиальным. Следовательно, чтобы получать надёжные результаты, нужно строго контролировать pH и состав подвижной фазы (а также их изменение, в случае градиентного режима). К тому же, интенсивность флуоресценции зависит от температуры, нередко в пределах от 1 до 5 %/°С. Источником возможных затруднений является также тушение излучения примесными тяжёлыми атомами.

Во-вторых, при флуоресценции, если концентрация аналита слишком высока, может наблюдаться так называемое *самопоглощение*. Оно проявляется как нелинейность в зависимости интенсивности флуоресцентного излучения от концентрации.

Третий недостаток, более всего ограничивающий применение этого вида детекторов, состоит в том, что свойством флуоресценции обладают довольно мало веществ. Чтобы обойти это ограничение, разработано множество реагентов, позволяющих получать флуоресцирующие производные анализируемых веществ. Это, с одной стороны, позволяет использовать флуориметрические детекторы для определения более широкого круга веществ, с другой, усложняет пробоподготовку и заставляет задумываться о стабильности получаемых производных.

3.11.Г Вопросы, общие для всех детекторов

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 3. **Слишком большой уровень шума на хроматограмме**.

УСТРАНЕНИЕ. Если шум присутствует на всей хроматограмме, причём уровень его меняется, вероятно, детектор не работает надлежащим образом. Причин возникновения такого шума три.

1. *Загрязнение проточной кюветы*. Проточные кюветы имеют малые размеры, чтобы не слишком увеличивать внеколоночный объём системы. Соответственно, и линзы (как правило, кварцевые) в кюветах весьма малы по размерам. Чтобы сигнал при работе источника был максимальным, излучение должно заливать всю поверхность линзы. Линзы либо приклеены,

либо закреплены с помощью прокладок, шайб и уплотнителей. В любом случае внутри кюветы имеются участки осаждения посторонних веществ. Обычно осаждение происходит, в первую очередь, на границе держателя и линзы, затем по всей линзе. Посторонние вещества осаждаются неравномерно, толщина и прозрачность их слоя различна. Независимо от структуры, такие вещества препятствуют прохождению света на светочувствительный диод, что проявляется как кажущееся снижение интенсивности источника.

В подобных случаях кювета нуждается в очистке. Порядок очистки изложен в документации изготовителя. Обычно следует с помощью насоса подать последовательность органических и кислотных промывных жидкостей. Как вариант, можно использовать переходник к шприцу (рис. 3.50), при этом необходимый объём растворителей для очистки резко снижается. Последовательность промывания может быть следующей: метанол, изопропиловый спирт, гексан, дихлорметан, затем в обратном порядке до метанола. После этого следует промыть детектор водой и сильно разбавлен-

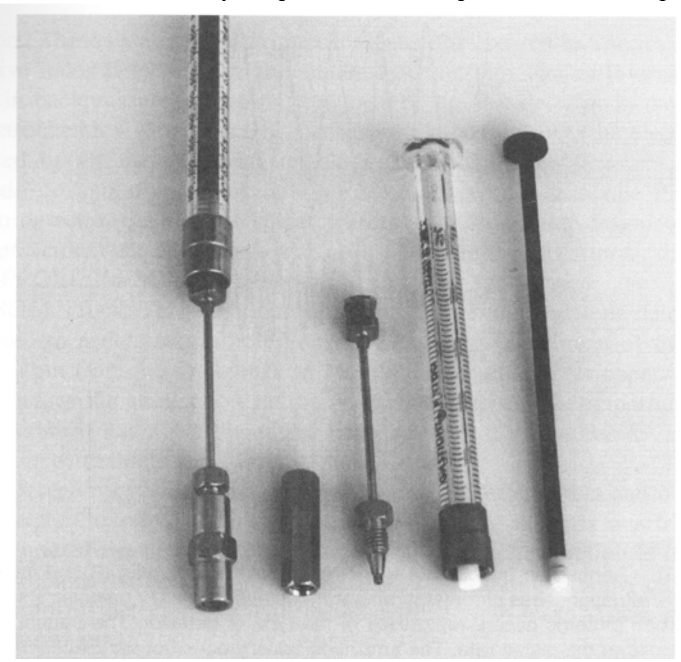


Рис. 3.50. Переходники с соединителями для промывания. Слева направо: переходник в сборе; соединитель с нулевым мёртвым объёмом; соединитель для шприца с луэровским наконечником; цилиндр; поршень с насадкой из ПТФЭ.

ной азотной кислотой (также предварительно проверив допустимость её применения по документации изготовителя). Заключительный этап состоит в промывании водой и, наконец, метанолом. Не следует пропускать разбавленную азотную кислоту через всю систему, если это прямо не рекомендовано изготовителем. И даже в этом случае не разрешается прокачивать азотную кислоту через колонку.

При промывании детектора не допускается приложение к шприцу избыточных усилий, поскольку в большинстве детекторов кювета выдерживает давление не более 0,7 – 1,4 МПа (100 – 200 фс/дюйм^2). Промывание детектора только в прямом направлении не всегда позволяет полностью его очистить. В этом случае не исключено, что поможет промывание обращением потока. Некоторые изготовители рекомендуют (и даже требуют) возвращать кювету в сборе на завод для чистки и обработки. При этом для установки в хроматограф присылают другую кювету.

2. *Течь в кювете*. Обычно эту неисправность не удаётся обнаружить, пока не оказывается, что очистка не даёт желаемого результата. В более старых моделях детекторов для ВЭЖХ проточные кюветы легко разбирались, а изготовители поставляли запасные части для замены при ремонте. Большинство современных конструкций детекторов этого не позволяют. Проточные кюветы изготавливают, испытывают и монтируют как моноблок. При необходимости, заменяют кювету целиком. Такой порядок обусловлен сложностью работы с кюветами, линзами и пр. крайне малых размеров и их юстировки.

3. *Попадание пузырьков воздуха*. Удалить их бывает чрезвычайно трудно. В особенности следует отметить, что эта неисправность зачастую как будто исчезает сама собой в градиентном опыте, но в начале следующего опыта проявляется снова. В первую очередь, следует промыть детектор. Чаще всего пузырьки воздуха образуются и задерживаются в загрязнённых кюветах, т.к. их образованию способствуют осаждённые внутри кюветы вещества. При образовании пузырьков воздуха шум на нулевой линии имеет характерный вид, согласованный с работой насоса (рис. 3.51).

Если промывание не даёт результата, следует демонтировать колонку, а насос присоединить прямо к детектору (если это проще, можно через инжектор). Прежде, чем подключать трубопровод к детектору, следует убедиться, что из трубопровода полностью вымыт воздух. Далее необходимо, увеличивая расход, попытаться «выгнать» пузырёк из детектора.

В некоторых случаях удаётся удалить пузырёк воздуха из детектора, незначительно увеличивая давление на выходе детектора. Для этого можно, например, слегка прижать трубку, через которую выводится элюат. При

этом следует внимательно наблюдать за общим перепадом давления в системе, не допуская его увеличения более, чем на 150 – 200 кПа (20 – 30 фс/дюйм^2). Иногда помогает промывание обращением потока (перед

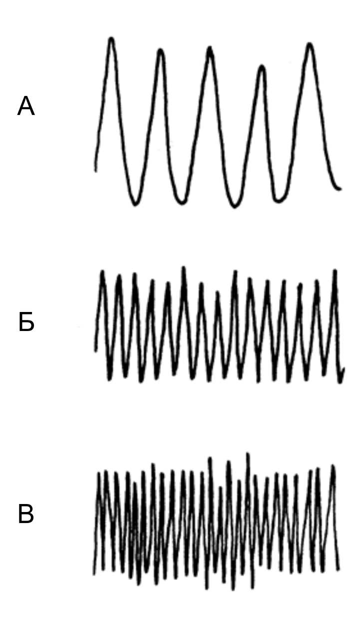


Рис. 3.51. Пузырёк воздуха в кювете детектора. (А) 0,5 мл/мин; (Б) 1,0 мл/мин; (В) 2,0 мл/мин. Хотя хроматограммы получены на УФ детекторе, другие типы детекторов дают сходную волнообразную форму нулевой линии. Частота колебаний совпадает с частотой хода поршня насоса. Амплитуда обычно остаётся неизменной.

этим обязательно следует проверить порядок промывания по документации изготовителя).

4. *Источник излучения выработал ресурс*. Большинство изготовителей указывают, что ресурс лампы составляет 1000 часов. Если детектор работает круглосуточно и непрерывно, лампа подлежит замене каждые 45 суток. Если детектор, как это бывает чаще, работает по 8 – 10 часов в сутки, срок службы лампы будет около четырёх месяцев. Одним из показателей того, что источник излучения нуждается в замене, является повышение уровня шума. Это бывает трудно заметить, если детектор не работает в предельно малом диапазоне поглощения.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 4. **Неправильное последовательное включение детекторов**.

УСТРАНЕНИЕ. При последовательном включении детекторов нужно иметь в виду три основных вопроса. Первый: не изменяется ли аналит в детекторе? Второй: выдержит ли детектор небольшой перепад давления, обусловленный следующим детектором? Третий: являются ли совместимыми условия при переходе от детектора к детектору?

Чаще всего используемые детекторы – УФВ с фиксированной длиной волны и матрицей фотодиодов – не вызывают никаких химических изменений в аналитах, равно как и флуориметрические детекторы. Поэтому их можно использовать первыми в последовательности. Рефрактометрические детекторы, хотя и являются также неразрушающими, но не выдерживают никакого повышения перепада давления, поэтому они должны быть последними.

Электрохимические детекторы, измеряющие ток при окислительно-восстановительных процессах (поток электронов, обусловленный тем, что аналит отдаёт электроны электроду или отбирает их с электрода), испарительные нефелометрические детекторы (в которых перед детектированием аналит выводится из раствора) и масс-спектрометры (в которых молекулы аналита разрушаются) являются разрушающими, следовательно, также могут быть лишь последними в хроматографической системе.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 5. **Пики слишком велики или слишком малы**.

УСТРАНЕНИЕ. Такое явление обычно наблюдается, когда автономные детекторы подключают к системе сбора и обработки данных. Для нормальной работы необходимо правильно выбрать уровень выходного сигнала детектора (1 В, 10 мВ и т.д.). Кроме того, в ряде случаев оказывается важным, какой коэффициент ослабления установлен на детекторе. Необходимо убедиться в том, что его значение не изменилось после предыдущего опыта. Наконец, следует проверить параметры системы сбора данных, выводимые на дисплей.

НЕШТАТНАЯ СИТУАЦИЯ Д 6. **Перегрузка детектора**. Под «перегрузкой» можно понимать два класса явлений. В первом случае форма пиков не меняется, но отклик детектора на изменение концентрации аналита становится нелинейным. Это явление не обязательно, но возможно, обусловлено перегрузкой детектора. Во втором случае перегрузка детектора приводит к искажению формы пиков. Зачастую на вершине пика появляется плато.

УСТРАНЕНИЕ. Определить, находится ли концентрация аналита в линейном диапазоне детектирования, можно двумя простыми способами. Первый состоит в построении калибровочной кривой с помощью серии

проб, в которых концентрация определяемого вещества ниже и выше предполагаемой концентрации при анализе. В большинстве случаев необходимо приготовить концентрации в диапазоне от 50 до 150 % от искомой. Если неизвестно, какой будет концентрация аналита, либо она изменяется в широких пределах, нужно построить калибровочную кривую для всего диапазона от предела обнаружения (самой низкой концентрации) до насыщения детектора (в области высоких концентраций). Следует помнить, что характеристика отклика детектора может быть нелинейной как в области низких, так и в области высоких концентраций анализируемого вещества. На калибровочной кривой – зависимости значения A от концентрации – выделяется линейный участок. Это не означает, что за пределами линейного диапазона детектирования работать нельзя. Однако нелинейный диапазон должен быть исследован более тщательно (в этом диапазоне следует записать большее количество растворов стандартных веществ с разной концентрацией).

Более грубый способ определения границы линейного диапазона состоит в использовании коэффициента отклика. Если линейный диапазон на калибровочной кривой определён, можно рассчитать в этом диапазоне коэффициент отклика (поглощение на единицу концентрации, A/C). Затем следует ввести эталонное вещество (стандарт), концентрация которого известна и находится вне первоначального диапазона. Если значение коэффициента отклика совпадает с полученным для линейного диапазона, концентрация раствора стандарта также находится в линейном диапазоне.

Если перегрузка детектора приводит к образованию плато на вершине пиков, с этим можно бороться двумя способами. Наиболее эффективный подход состоит в том, чтобы уменьшить концентрацию аналита в пробе путём разведения. Второй – в том, чтобы перейти в диапазон меньшей чувствительности детектора (например, на длину волны, где молярный коэффициент поглощения аналита ниже, если применяется УФ детектор, или на другие длины волн возбуждения и испускания, если используется флуориметрический детектор).

3.12 ТЕКУЩИЙ КОНТРОЛЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ГРАФИК РЕГЛАМЕНТНЫХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ РАБОТ

Текущий контроль показателей хроматографической системы и составление графика регламентных профилактических работ являются взаимодополняющими мероприятиями. Применительно к новым методикам новым

приборам, текущий контроль параметров хроматографа даёт оператору точную картину среднего срока службы разных элементов системы ВЭЖХ: колонок, инжектора, насоса и детектора. Обычно для текущего контроля используют так называемые параметры пригодности системы (при работе с несколькими пиками), а именно: наименьшее допустимое количество теоретических тарелок для пика определяемого вещества, N; наименьшая величина разрешения двух важнейших пиков, α или R_s; коэффициент размытия пика или коэффициент асимметрии, A или T (подробно эти параметры описаны в главе 2). Важно, что показатели контролируются для системы, находящейся в эксплуатации, для определяемых веществ и именно тем способом, который предписывает методика.

Например, если методика требует использования защитной колонки, может оказаться, что коэффициент асимметрии пика достигает допустимого предела через 1000 вводов пробы. После замены колонки его значение опять возвращается в допустимые пределы. Следовательно, разумно предусмотреть в графике регламентных профилактических работ замену защитной колонки после ввода каждой тысячи проб. Как вариант, в графике может быть предусмотрена альтернатива («ИЛИ»): замена будет требоваться после ввода 1000 проб, или по достижении предельного допустимого значения, или по прошествии определённого срока. Важно, что замену колонки необходимо произвести *до того*, как достоверность данных будет вызывать сомнения.

3.12.А Валидация системы и параметры пригодности

Чрезвычайно важно, чтобы система ВЭЖХ в продолжение аналитического разделения имела неизменные и приемлемые показатели. Регуляторные органы требуют предоставлять доказательства того, что каждый анализ выполнялся в контролируемых условиях. Что это значит? Очевидный ответ состоит в том, что результаты анализов должны отвечать требуемым значениям точности и сходимости. Валидация является длительным и трудоёмким процессом. В частности, требуется предоставлять документы, по которым можно было проследить историю каждого из элементов системы ВЭЖХ. Следовательно, все блоки хроматографа должны быть испытаны по отдельности, результаты документированы, и на основании их изучения сделан вывод о том, что их рабочие параметры находятся в допустимых пределах.

К числу важнейших параметров, изучение которых входит в процесс валидации, относятся следующие:

Для изократических насосов

1. Значения точности и сходимости величин скоростей потоков:
   (а) не выходят за допустимые пределы в нормальном рабочем диапазоне значений расходов элюентов (например, 0,5–3,0 мл/мин);
   (б) также контролируются в процессе смешения элюентов с помощью насоса;
   (в) сохраняются в требуемом диапазоне вязкости элюентов (например, объёмные доли изопропанола и воды, 100 % гексан).

Для градиентных насосов

1. Значения точности и сходимости расхода, не выходят за пределы показателей описанных выше, при работе и в градиентном режиме.
2. Получаемые профили градиентов имеют хорошее качество, особенно линейный и линейный с плато, а также профили градиента, наиболее часто используемые в этой лаборатории.

Объёмный расход определяется прямым измерением объёма, подаваемого насосом за известный промежуток времени. Для контроля качества градиента в растворитель Б добавляют некоторое количество вещества, вызывающего отклик детектора. Например, для проверки с помощью детектора УФ диапазона качества профиля градиента смеси метанола с водой, который формируется при помощи насоса, можно добавить в метанол небольшое количество (0,5 – 2 %) ацетона. Профиль градиента регистрируют и сравнивают фактическое изменение доли элюента Б во времени с запрограммированным графиком.

Если хотя бы один из параметров насоса выходит за пределы, указанные в документации производителя, осуществляют наладку или ремонт, после чего систему испытывают повторно. Показатели системы не подвергаются валидации, пока контролируемые параметры насоса не войдут в заданные регламентированные пределы.

Для инжектора

1. Сходимость результатов, определяемых работой инжектора измеряется по меньшей мере по шести повторным вводам раствора известной концентрации:
   (а) объем водимых проб при испытаниях должен перекрывать диапазон, обычно используемый в лаборатории, чаще всего от 2 до 100 мкл;
   (б) для оценки влияния вязкости растворителя для проб на качество результатов измерений следует провести испытания растворов

различной вязкости (например, используя изопропанол и ацетонитрил), чтобы перекрыть возможный диапазон вязкостей, обычно используемый в лаборатории.

2. С целью испытания влияния на качество измерений устройства для автоматического ввода проб (автосамплера), осуществляющего последовательное разбавление, следует проверить точность ряда последовательных разбавлений, перекрывающих пределы, обычно используемых в лаборатории (например, от 20-500 мкл до 1 мл).

Если хотя бы один из параметров инжектора выходит за пределы, указанные в документации производителя, необходимо осуществить наладку или ремонт, после чего систему испытать повторно. Показатели системы не подвергаются валидации, пока контролируемые параметры инжектора не войдут в заданные регламентированные пределы.

Для колонки

1. При получении колонки её необходимо испытать на эффективность по методике, либо предложенной производителем, либо разработанной и описанной в лаборатории:
   (a) необходимо документировать при этом также значения времён удерживания и перепад давления в системе.
2. Для каждого испытания должен иметься набор показателей, по которым определяют пригодность колонки для данного разделения. Эти параметры обычно включают в себя следующие, но не обязательно ограничиваются ими: коэффициент ёмкости (k'), разрешение (α или Rs), число теоретических тарелок (N) или высота, эквивалентная теоретической тарелке (h), коэффициент размытия пика (T) или коэффициент асимметрии (Ax).

Если хотя бы один из параметров колонки выходит за пределы, указанные в документации изготовителя, колонку следует заменить, после чего систему испытать повторно. Показатели системы не подвергаются валидации, пока контролируемые параметры колонки не войдут в заданные (паспортные или регламентированные) пределы.

Для детектора (например, УФ) необходимо

1. Задать длину волны с помощью фильтра (например, из оксида гольмия).
2. Измерить отклик с помощью набора фильтров или специально приготовленных растворов:

(a) следует отдавать отчет в том, что этот процесс не позволяет различить проявление снижения интенсивности источника от влияния загрязнения кюветы.

3. Определить дрейф нулевой линии (обычно в процессе прокачивания подвижной фазы).

Если хотя бы один из параметров детектора выходит за пределы, указанные в документации изготовителя, необходимо осуществить наладку или ремонт, после чего систему испытать повторно. Показатели системы не подвергаются валидации, пока контролируемые параметры инжектора не войдут в заданные паспортные пределы.

В основе процесса валидации лежит требование обязательного регистрирования и документирования всех результатов испытаний, которые должны заверяться подписями лиц, ответственных за проведение валидации, с указанием дат проведения испытаний. Чтобы повысить надёжность этого процесса и придать ему независимый характер, зачастую работы по валидации поручают сторонним организациям. Другими причинами, по которым следует прибегать к помощи сервисных организаций, является наличие у них наборов для испытаний и запасных частей к приборам. Кроме этого, их сотрудники регулярно повышают квалификацию, чтобы выполнять поставленные задачи в отведённые минимальные сроки.

3.12.Б Валидация методик

Валидация методики – это процесс, с помощью которого методика анализа проверяется таким образом, чтобы продемонстрировать её точность и сходимость при использовании более, чем одним специалистом в более, чем одной лаборатории. Зачастую разработками методик занимается исследовательская лаборатория. Конечная же цель состоит в том, чтобы перенести разработанную методику в лаборатории контроля качества, отвечающие за испытания продукции, документирование и хранение результатов испытаний и выдачу разрешений на отпуск продукции потребителю. В самых общих чертах этот процесс выглядит следующим образом.

1. Необходимо определить цель анализа, а именно, аналиты и матрицу.
2. Разработать методику разделения и детектирования аналитов (например, обращённо-фазная ВЭЖХ, детектирование в УФ диапазоне).
3. Для каждого аналита определить линейный рабочий диапазон концентраций.
4. Выбрать и оптимизировать порядок пробоподготовки.

5. Выполнить опыты с пробами, холостыми растворами и холостыми растворами с введёнными в них стандартами:
   (а) ввести по три пробы каждой из пяти масс (определение сходимости методики);
   (б) выполнить анализ холостой вытяжки матрицы без аналитов (определение специфичности);
   (в) ввести шесть проб одного и того же вещества (определение сходимости приборной части);
   (г) построить калибровочную кривую с использованием стандартов в диапазоне концентраций от 50 % до 150 % от номинальной (определение линейности); для проб, где ожидаемый разброс концентраций хуже определён или для аналитов, присутствующих в малых концентрациях, на этом этапе следует выполнить: (i) определение всего линейного диапазона; (ii) определение значений пределов обнаружения и пределов количественного определения;
   (д) определить коэффициент извлечения введённого стандарта с концентрацией 100 % номинальной (определение точности);
   (е) в последнюю очередь, провести анализ раствора стандарта с концентрацией 100 % от номинальной (определение устойчивости аналита и возможного изменения показателей системы во времени).

Дополнительно некоторые методики могут требовать доказательства того, что малые изменения рабочих параметров (например, pH, состава подвижной фазы, температуры и пр.) мало влияют или вовсе не влияют на результаты анализа. Это – демонстрация устойчивости («робастности») методики.

6. Методику необходимо документировать и направить в другую лабораторию (т.н. перенос методики с последующей её валидацией).
7. Другая лаборатория (как правило, лаборатория контроля качества или сторонняя лаборатория, сотрудничающая с разработчиком методики) проводит испытания методики на выносливость, проводя анализ тех же проб с использованием:
   (а) другой колонки того же типа;
   (б) других партий аналогичных стандартов;
   (в) другой приборной части;
   (г) других операторов.

Все результаты испытаний заносят в таблицы и оценивают статистически. Если заданные параметры валидации методики выдержаны, методика считается прошедшей валидацию. Далее необходимо разработать точное описание именно этой методики. Соответствующий документ называется стандартной операционной процедурой (СОП), предназначенной для выполнения данного вида анализа. При проведении всех последующих работ необходимо придерживаться этого документа и его содержания. В документе также должен приводится перечень критериев и критических показателей системы. Критерии представляют собой точно определённые допустимые пределы значений. Показатели системы в каждом из опытов сравнивают с указанными критериями. Если они выдерживаются, опыт считается корректным, результаты принимаются. Критерии являются также параметрами, по которым судят о пригодности системы.

3.12.В Текущий контроль работы хроматографической системы

На практике, текущий контроль работы и регистрация показателей сис-

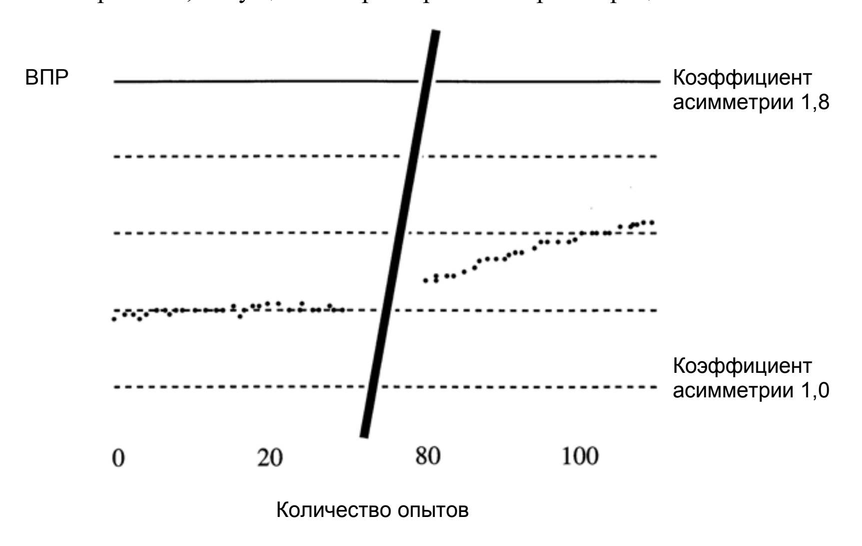


Рис. 3.52. График одностороннего ограничения, используемый для задания и текущего контроля наименьших допустимых значений параметра. В данном примере параметром, ограниченным только сверху, является коэффициент асимметрии пика. По мере старения колонки асимметрия обычно медленно монотонно возрастает.

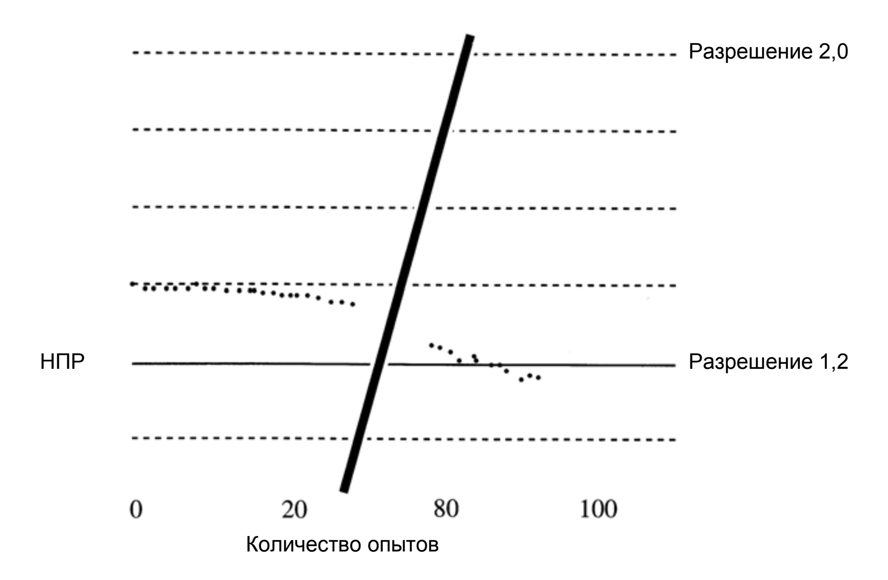


Рис. 3.53. График одностороннего ограничения, используемый для задания и текущего контроля наибольших допустимых значений параметра. В данном примере параметром, ограниченным только снизу, является разрешение. По мере старения колонки асимметрия обычно медленно монотонно убывает. Это обусловлено всё большим удлинением среза пика (см. рис. 3.52, иллюстрирующий асимметрию) и ухудшением разделения (из-за медленного вымывания привитой фазы).

темы дают возможность гарантировать, что получаемые результаты измерений корректны. Но отслеживание показателей работы хроматографической системы важно и для других целей. Эти показатели позволяют судить о том, как работает система, в тот или иной момент времени, а замечаемые тенденции их изменения во времени дают возможность легко скорректировать её работу, не выводя хроматограф из эксплуатации или, по меньшей мере, сводя его простой к минимуму. На рис. 3.52 – 3.55 показаны графики и таблицы, которые можно использовать для текущего контроля. Следует отметить, что приведенные допустимые параметры имеют свои верхние и нижние предельные значения, зачастую получаемые из экспериментальных результатов. Их называют верхним и нижним пределами регулирования (ВПР и НПР). Чаще всего значение $\pm 2\sigma$ принимается в качестве предупреждающего, а достижение значения $\pm 3\sigma$ говорит о том, что система стала неуправляемой и подлежит немедленному отключению. Примерами параметров пригодности системы, имеющих ВПР и НПР, могут быть значе-

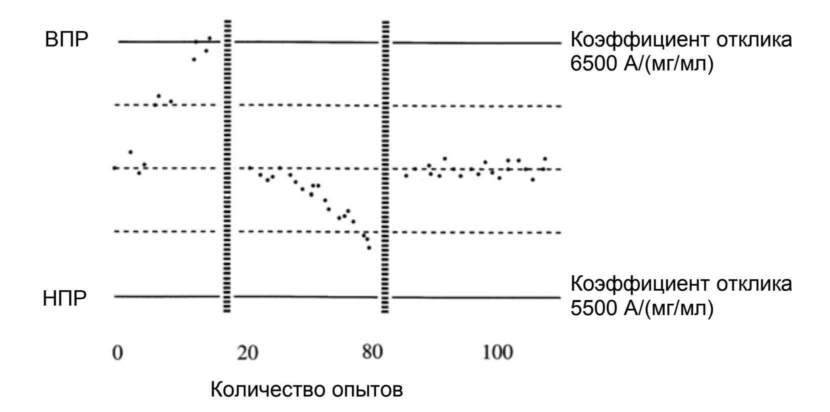


Рис. 3.54. График двустороннего ограничения, используемый для задания и текущего контроля допустимых значений параметра. В левой части рисунка резкое увеличение коэффициента отклика обусловлено потерей растворителя, использованного для приготовления пробы и, как следствие, возрастания концентрации аналита в пробе. В средней части показано медленное убывание коэффициента отклика. Это может свидетельствовать о постепенном снижении интенсивности источника. Справа показан типичный разброс, обусловленный нормальной статистической изменчивостью. Величина разброса зависит от системы в целом (проба и хроматограф).

ния асимметрии пика (или коэффициента размытия пика), времен удерживания или k' («рабочее окно»), а также коэффициента отклика.

Некоторые параметры имеют пределы лишь «с одной стороны». В частности, ограничены только снизу значение числа теоретических тарелок, N (нижний предел которого соответствует минимально допустимой эффективности колонки), и разрешение. Примером параметра, ограниченного только сверху, может быть значение максимального давления в системе. Поскольку эти величины не распределены относительно среднего, верхний или нижний пределы задаются как абсолютные величины. Например, можно задать наименьшее значение предельно допустимого разрешения R_s на уровне 1,5.

Постоянный текущий контроль параметров пригодности системы играет две важные роли. Во-первых, что наиболее важно, он позволяет статистически достоверно показать, что данные, полученные в период, когда все параметры находятся в допустимых пределах, корректны и могут быть использованы. Второе достоинство текущего контроля параметров в том, что нетрудно заметить тенденции изменения показателей системы, после чего могут быть своевременно приняты профилактические меры. Например, если замечено повышение давления в системе, возможно, следует

кратковременно промыть колонку обращением потока. Как правило, профилактические меры можно осуществить легко и быстро. Тем самым можно предупредить серьёзные неисправности, приводящие к выходу системы из строя, потере данных, проб, времени и веществ.

3.12.Г График регламентных профилактических работ

В современной аналитической лаборатории значение организации регулярных профилактических работ становится всё важнее. Когда-то они сводились к периодической замене уплотнений плунжеров насосов, предколонок и ламп детектора. Эти работы не утратили важности для надлежащего функционирования систем ВЭЖХ и сегодня, однако общий спектр профилактики значительно расширился.

Причиной стала общая концепция *валидации системы*. Что такое валидация *методики*, понять несложно. Основными аспектами, имеющими значение для правильного функционирования приемлемой аналитической методики, являются точность, сходимость и воспроизводимость получаемых результатов, её линейный диапазон, пределы обнаружения, и устойчивость.

В отличие от этого, валидация хроматографической системы, как понятие, на современном этапе включает калибровку детектора по длинам волн и интенсивностям, контроль программ профилактических работ, определение расходов, проверку показателей системы сбора данных. Ряд этих задач решаются, хотя и косвенным образом, если проводится текущий контроль параметров пригодности системы и ведется соответствующая документация. Имеется множество сертифицированных компаний, оказывающих услуги по валидации. Эти услуги стоят довольно дорого, но решают сразу две задачи, с одной стороны, четко выполняется график регламентных профилактических работ, а с другой – проводится экстренный ремонт оборудования, а кроме того, производится оформление независимой документации показателей системы с заданной периодичностью.

В таблице 3.5 приведены элементы системы и типовые сроки регламентных профилактических работ. Следует обратить внимание, что указанные сроки соответствуют нормальной загрузке лаборатории – примерно от 8 до 10 часов в сутки, пять дней в неделю. При более интенсивной эксплуатации сроки проведения работ следует соответствующим образом изменить.

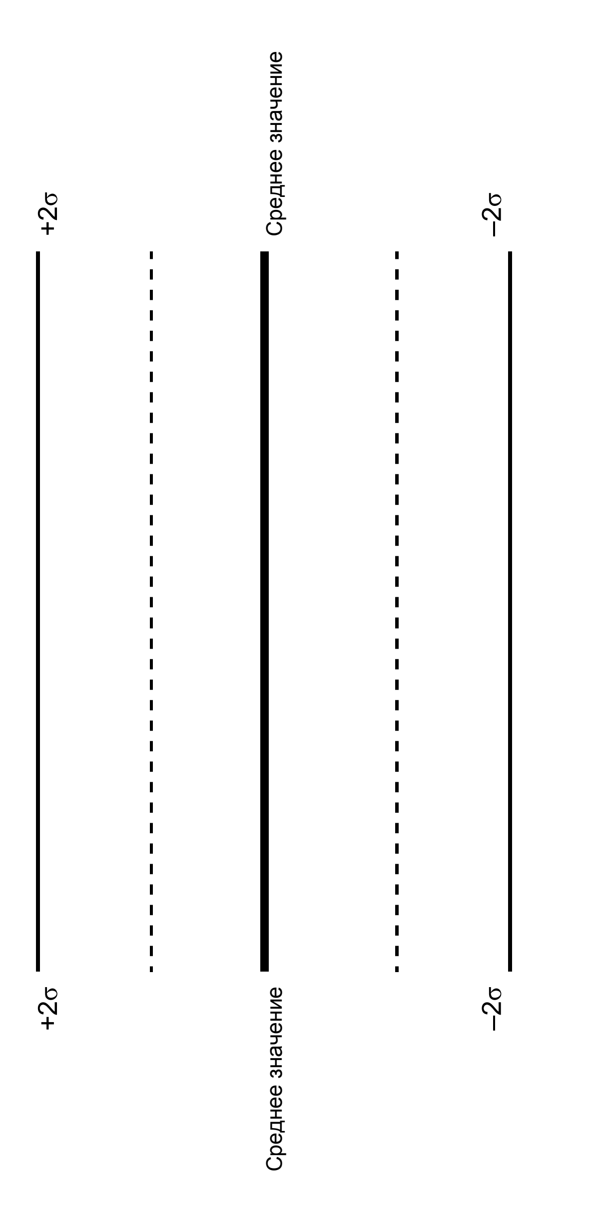


Рис. 3.55. График двустороннего ограничения, используемый для задания и текущего контроля допустимых значений параметров. Если система эксплуатируется длительно с множеством проб, можно построить статистическую зависимость (± 2σ). График часто используется для контроля конечных значений концентрации и т.п.

Дата	Значение

–3σ	–2σ	–σ	Среднее	+σ	+2σ	+3σ

Рис. 3.55. Продолжение.

Таблица 3.5.
График регламентных профилактических работ

Элемент	Периодичность	Примечание
Резервуары	При каждой смене растворителя	Следует соответственно заменить маркировку
Входной фильтр и трубопровод	Каждые 6 – 9 месяцев	Следует согласовать с профилактикой насоса
Обратные клапаны	Каждые 6 – 9 месяцев	Очистка и замена – по мере необходимости
Уплотнения плунжеров насосов	Каждые 6 – 9 месяцев	Следует проверить фактический расход при малой и большой установках
Поршень	Каждые 6 – 9 месяцев очистка; замена – только в случае повреждения	
Предколонка	Каждые 1 – 2 месяца	В зависимости от интенсивности эксплуатации и агрессивности элюента
Проходной фильтр	Каждые 2 – 3 месяца	
Инжектор (ручной):		
Порт иглы	Каждые 6 – 9 месяцев	Подлежит замене
Ротор	Каждые 1 – 2 года	Подлежит замене
Петля-дозатор	Каждые 6 – 9 месяцев	Подлежит очистке; замена – по необходимости
Шприц	Каждый месяц	Подлежит очистке или замене; поршень и корпус следует хранить совместно
Инжектор (автоматический)	Каждые 6 – 9 месяцев	Следует придерживаться рекомендаций изготовителя
Соединительные трубки	Каждые 6 – 9 месяцев	Очистка и замена – по мере необходимости
Защитная колонка	Каждые 1 – 2 месяца	Определяется по параметрам пригодности системы
Колонка	Каждые 6 – 9 месяцев	Определяется по параметрам пригодности системы
Источники излучения	Каждые 1000 часов наработки	Или с иной периодичностью, по рекомендациям изготовителя

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Schill, *J. Biochem. Biophys. Methods* **18,** 249 (1989).
2. W. R. Melander and Cs. Horvath, in *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives,* Volume 2, Cs. Horvath (ed.), Academic Press, New York, 1980 (У. Меландер, Ч. Хорват. В кн.: Высокоэффективная жидкостная хроматография: преимущества и перспективы. т. 2. Под ред. Ч. Хорвата).
3. K. Kotzabasis, M. D. Christakis-Hampsas, and K. A. Roubelakis-Angelakis, *Anal. Biochem,* 214, 484 (1993).
4. P. A. Carson and C. J. Mumford, *The Safe Handling of Chemicals in Industry,* John Wiley & Sons, New York, 1988 (П. Карсон, К. Мамфорд. Безопасность при работе с химическими веществами в промышленности).
5. S. G. Luxon (ed.), *Hazards in the Chemical Laboratory,* 5th edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1992 (Опасности в химической лаборатории. Ред. С. Лаксон, 5-е изд.).
6. I. M. Kolthoff, E. B. Sandell, E. J. Meehan, and S. Bruckenstein, *Quantitative Analytical Chemistry,* 4th edition, Macmillan, New York, 1969, p. 854 (И. Колтхоф и др. Количественная аналитическая химия. 4-е изд.).
7. *Publications Data Sheet 1-655,* Rev. 87, National Safety Council, Chicago, 1987 (Листок технической информации Национального совета по технике безопасности США).
8. *ACS Reagent Chemicals,* 8th edition, American Chemical Society, Washington, DC, 1993, p. 323 (Каталог химических реактивов Химического общества США).
9. ACS *Reagent Chemicals,* 8th edition, American Chemical Society, Washington, DC, 1993, pp. 246, 301 (Каталог химических реактивов Химического общества США).
10. J. N. Brown, M. Hewins, J. H. M. van der Linden, and R. J. Lynch, *J. Chromatogr.* **204,** 115 (1981).

УКАЗАТЕЛЬ ТЕРМИНОВ

Данный раздел может быть использован как «словарь» для получения краткой справки по хроматографической терминологии и номенклатуре литературы по ВЭЖХ. Термины приведены в алфавитном порядке с указанием английских эквивалентов.

Автоинжектор: см. **Автоматическое устройство ввода пробы**

Автоматическое устройство ввода пробы (*Autoinjector*)

Блок хроматографа, который вытесняет из употребления ручные инжекторы. Обычно является программируемым и позволяет с высокой сходимостью выдерживать объём пробы в широких пределах.

Автоматическое устройство подготовки и ввода пробы (*Autosampler*)

Устройство с теми же возможностями, что **автоинжектор**, с возможностью дополнительной обработки пробы перед вводом, например, последовательное разбавление, введение дополнительных веществ и внутренних стандартов.

Автосамплер: см. **Автоматическое устройство подготовки и ввода пробы**

Адсорбент (*Adsorbent*).

Неподвижная фаза набивки колонки. Чаще всего термин применяется в **жидкостно-адсорбционной хроматографии**.

Адсорбционная хроматография: см. **Жидкостно-адсорбционная хроматография**

Алкоксисилан (*Alkoxysilane*)

Реактив, используемый для химического модифицирования поверхности окиси кремния, имеющий структуру $(RO_{4-x})SiR_x'$. Пример получения производной окиси кремния с помощью триэтоксиалкилсилана:

$$Si–OH + (CH_3CH_2O)_3SiR' \rightarrow Si–O–SiR'.$$

Аминопропиловая привитая фаза (*Aminopropyl bonded phase*)

Нормально-фазный носитель со структурой поверхности $Si–O–SiCH_2CH_2CH_2NH_2$. Широко используется для разделения простых сахаров. Также представляет собой слабый анионообменный сорбент.

Амфоионы (*Zwitterions*)

Молекулы, несущие как положительный, так и отрицательный заряд, разнесённые в пространстве.

Амперметрический (электрохимический) детектор (*Amperometric detector*)

Детектор, измеряющий силу тока при окислении или восстановлении аналита в контакте с электродом. Окисляется или восстанавливается лишь небольшая часть аналита. Измеряет силу тока в амперах.

Амфолит (*Ampholyte*)

Вещество, проявляющее как основные, так и кислотные свойства. Например, H_3PO_4 – кислота, но HPO_4^{-2} – амфолит, поскольку это вещество способно как протонироваться до $H_2PO_4^-$, так и депротонироваться до PO_4^{-3}.

Амфотерные ионы: см. **Амфоионы**

Анализ с вводом пробы в поток (*Flow-injection analysis*)

Метод, при котором пробу вводят в поток подвижной фазы через трубку без набивки. Зона пробы переносится в детектор, генерирующий профиль, который затем интегрируется.

Анализируемое вещество: см. **Аналит**

Аналит (*Analyte*)

Компонент пробы, применительно к которому получают количественные или качественные результаты.

Аналитическая колонка для ВЭЖХ (*Analytical HPLC column*)

Колонка длиной от 50 до 300 мм, внутренним диаметром от 3,0 до 4,6 мм. См. табл. 1.1.

Анион (*Anion*)

Атом или молекула, несущие отрицательный заряд.

Анионный обмен (*Anion exchange*)

Тип ионообменной хроматографии, в котором поверхность материала набивки несёт положительный заряд и используется для разделения анионов. Привитые к поверхности четвертичные амины образуют основу с сильными анионообменными свойствами, первичные амины – основу со слабыми анионообменными свойствами.

Анионообмен: см. **Анионный обмен**

Артефакт (*Artifact*)

Любой пик хроматограммы, полученный не за счёт характерных компонентов пробы или подвижной фазы.

Аффинная хроматография (*Affinity chromatography*)

Метод, в котором для разделения используется высокоспецифичное взаимодействие лиганда, привитого к адсорбенту (например, фермент или гаптен) с основой. Высвобождение аналитов происходит за счёт конкуренции на связях, аналит получается в высокоочищенном виде.

Блокирование остаточных силанольных групп поверхности (*Endcapping*)

Процесс вторичного химического модифицирования с целью преобразования как можно большей части поверхностных силанольных групп. В качестве реагентов для блокирования чаще всего используют триметилхлорсилан, диметилдихлорсилан и гексаметиллисилазан.

Бутильная привитая фаза (*Butyl bonded phase*)

Сорбент для обращёнено-фазной хроматографии со структурой поверхности $Si–O–SiCH_2CH_2CH_2CH_3$. Широко используется для разделения белков и пептидов, при этом в качестве носителя используется силикагель с большим размером пор (300 Å).

Буфер (*Buffer*)

Соединение, добавляемое к подвижной фазе, чтобы обеспечить постоянство значения некоторого её параметра. Чаще всего используют кислотные или основные буферы, чтобы выдержать значение pH. Для этого концентрация буфера должна быть довольно большой (обычно от 50 до 200 мМ). Используют также окислительно-восстановительные и другие буферы.

Ваканто-хроматография (*Vacancy peak chromatgoraphy*)

Способ, при котором используется подвижная фаза, дающая сильный постоянный сигнал. При элюировании определяемого вещества сигнал уменьшается за счёт сольватационного эффекта, в отличие от обычного варианта детектирования. Глубина впадины соответствует концентрации аналита. Так определяют некоторые анионы.

Валидация (*Validation*)

Процесс получения документального подтверждения того, что методика пригодна для выполнения данного анализа. При этом проверя-

ются её критические параметры, такие, как сходимость, точность, линейность, воспроизводимость, выносливость и устойчивость.

Ввод пробы (*Injection*)

Процесс введения пробы известного объёма в поток, переносящий пробу в колонку.

Ввод пробы непосредственно в колонку (*On-column injection*)

Редко применяемый приём ввода пробы непосредственно в головную часть колонки. В этом случае инжектор и соединительные трубопроводы не используются. Соответственно, внеколоночный объём сводится к минимуму, и достигается наибольшая эффективность.

Вихревая диффузия (*Eddy diffusion*)

Размытие хроматографической зоны из-за различий путей прохождения потока внутри колонки.

Внеколоночный объём (*Extracolumn volume*)

Объём, привносимый такими элементами хроматографа, как инжектор, соединительные трубки, кювета детектора, а также другими элементами (кроме колонки), расположенными между инжектором и детектором. Чем больше внеколоночный объём по сравнению с объёмом колонки, тем ниже эффективность системы. Подробнее см. раздел 2.2.

Внутренний стандарт (*Internal standard*)

Соединение, сходное по структуре с анализируемым, но разделяемое с ним в ходе хроматографического анализа. Внутренний стандарт используется в следующих целях: (1) для компенсации изменений, вносимых в процессе ввода пробы и обусловленных приборной частью; (2) для текущего контроля степени извлечения в процессе пробоподготовки; (3) для расчёта коэффициента отклика, по которому затем получают количественные результаты.

Внутренняя обращённо-фазная хроматография (*Internal reversed-phase chromatography*)

Способ хроматографического разделения на сорбенте, который содержит на наружной поверхности полярные функциональные группы, а внутри пор – неполярные (т.е. обращённо-фазные).

Водородная связь (*Hydrogen bonding*)

Вторая связь с другим гетероатомом, образованная ковалентно-связанным атомом водорода. Водородные связи могут быть как межмолекулярными, так и внутримолекулярными.

Время выхода неудерживаемого компонента, t_0 (*Void time*)

Промежуток времени, за который неудерживаемый или не проникающий в поры (в эксклюзионной хроматографии) компонент проходит от инжектора до детектора.

Время отклика: см. **Постоянная времени**

Время уравновешивания (*Reequilibration time*)

При градиентном элюировании – время, необходимое, чтобы состав подвижной фазы вернулся к начальному, а колонка пришла в равновесие с этим составом.

Время удерживания, t_r (*Retention time*)

Промежуток времени между вводом пробы и детектированием пика данного определяемого вещества.

Встречное промывание: см. **Обращение потока** (2)

Выносливость методики (*Ruggedness*)

Термин, используемый при валидации методики, и характеризующий то, насколько она воспроизводима при изменении таких условий её выполнения, как другие оператор, прибор, лабораторий и источник химреактивов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (*High-performance liquid chromatography, HPLC*)

Метод, используемый в настоящее время почти повсеместно. Ранее называлась также «жидкостная хроматография высокого давления». Отличается от варианта низкого давления в 100 – 1000 раз более высоким значениям перепада давления при прокачивании подвижной фазы через колонку. Соответственно, в отличие от перистальтического насоса, используемого при низком давлении, для ВЭЖХ требуется возвратно-поступательный поршневой насос высокого давления. В рамках метода ВЭЖХ имеется множество вариантов, в частности, ионообменная, обращённо-фазная, нормально-фазная, аффинная, хиральная и ион-парная хроматография.

Высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ, H (*Height equivalent to a theoretical plate, HETP*)

Параметр, свидетельствующий об эффективности колонки. Рассчитывается по числу теоретических тарелок, N, и длине колонки, L : $H = L/N$. Чем он ниже – тем выше эффективность колонки. Подробнее см. раздел 2.2.

ВЭЖХ: см. **Высокоэффективная жидкостная хроматография**.

ВЭТТ: см. **Высота, эквивалентная теоретической тарелке**.

Вязкость, η (*Viscosity*)

Мера сопротивления жидкости течению. Измеряется в сантипуазах (сП; 1 сП = 1 мПа·с).

Гайка накидная (*Nut*)

Деталь, с помощью которой при соединении трубок обжимная втулка сжимается между трубкой и муфтой.

Гель-проникающая хроматография (*Gel permeation chromatography, GPC*)

Вариант разделения соединений, различающихся по размеру молекул (как правило, имеющих достаточно большую молекулярную массу, – полимеров, белков и олигонуклеотидов). Материал набивки представляет собой полимер (зачастую сополимер стирола и дивинилбензола), подвижная фаза строго безводная. Гель-фильтрационная хроматография – разновидность эксклюзионной хроматографии.

ГПХ: см. **Гель-проникающая хроматография**

Гель-фильтрационная хроматография (*Gel filtration chromatography, GFC*)

Вариант разделения соединений, различающихся по размеру молекул (как правило, имеющих достаточно большую молекулярную массу, – полимеров, белков и олигонуклеотидов). Материал набивки представляет собой полимер (зачастую полидекстран), подвижная фаза водная. Гель-фильтрационная хроматография – разновидность эксклюзионной хроматографии.

ГФХ: см. **Гель-фильтрационная хроматография**. *(GFC)*

Гидратация (*Hydration*)

Химическое связывание молекул соединений с молекулами воды. В ВЭЖХ данный термин употребляется в двух важных случаях: (1) гидратация немодифицированной поверхности носителя, например, оксида кремния, дезактивирует его; (2) во многих определяемых веществах, полярных или образующих водородные связи, имеется связанная гидратационная вода.

Гидрофобное взаимодействие (*Hydrofobic interaction*)

Предпочтительное взаимодействие неполярных групп в молекулах определяемого вещества с неполярными группами на поверхности неподвижной фазы по сравнению с взаимодействием с молекулами воды. Обычно наблюдается в обращённо-фазной ВЭЖХ, когда подвижная фаза зачастую содержит довольно большое количество воды.

Градиентное элюирование (*Gradient elution*)

Режим хроматографического разделения, которое происходит под влиянием изменения состава подвижной фазы. Обычно используется с целью сокращения продолжительности анализа и улучшения формы пиков, выходящих последними.

Градиентный смеситель (*Gradient mixer*)

Смеситель, в котором градиент элюента формируется либо перед головкой насоса (смеситель низкого давления), либо после головки насоса (смеситель высокого давления). Два способа получения градиента требуют разных показателей производительности насосной системы для растворителей.

Градуировочная кривая: см. **Калибровочная кривая**.

Граница пропускания в УФ диапазоне (*UV cutoff*)

Длина волны, на которой поглощение растворителя в 1-см кювете равно 1,0 (по сравнению с воздухом). См. в табл. 1 в Приложении границы пропускания в УФ диапазоне часто применяемых растворителей.

Датчики и преобразователи давления (*Pressure transducers and pressure gauges*)

Элементы, помещаемые между головкой насоса и инжектором, предназначенные для измерения давления на входе в колонку. Играют роль как защитного приспособления (если значение давления превышает допустимое, система принудительно отключается), так и средства сигнализации о необходимости профилактики (быстрое резкое или длительное постепенное изменение значения давления зачастую свидетельствуют о нарушении нормальной работы системы).

Дегазация (*Degassing*)

Процесс удаления растворённых газов (в частности, кислорода) из элюента. Наиболее распространёнными приёмами дегазации являются

ультразвуковая обработка, вакуумирование, барботирование гелием или аргоном.

Деактивация (*Deactivation*)

Связывание молекул воды водородными связями с поверхностными гидроксильными группами непрореагировавших оксидов (т.е. оксидов кремния и алюминия). Когда вода присутствует в подвижной фазе, её молекулы связываются с этими группами и делают их недоступными для молекул анализируемых веществ, чем исключается адсорбция последних. В результате сокращаются времена удерживания. Удаление адсорбированных молекул воды называется реактивацией носителя.

Деактивированная окись кремния (*Deactivated base silica*)

Диоксид кремния, обработанный кислотой с целью удаления примесных металлов, с последующей отмывкой сорбента водой. В привитофазной хроматографии наличие непрореагировавших силанольных групп является нежелательным, поскольку при разделении веществ, образующих сильные водородные связи, например, первичных аминов, имеет место размытие пиков с образованием «хвостов». Деактивация поверхности (перед её дериватизацией) позволяет получать колонки с химически однородной поверхностью и лучшими хроматографическими характеристиками применительно к анализируемым веществам, образующим водородные связи.

Дериватизация: см. **Получение производных**.

Десорбция (*Desorption*)

Переход разделяемого компонента с поверхности адсорбента в подвижную фазу.

Детектор (*Detector*)

Элемент системы ВЭЖХ, используемый для обнаружения присутствия анализируемого вещества в элюате на выходе колонки.

Детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов (*Ultraviolet - visible detector*; *UV-vis detector*)

Детектор, измеряющий оптическое поглощение подвижной фазы. Для определения концентрации анализируемых веществ используется закон Бэра: $A = \varepsilon bc$.

Детектор УФВ: см. **Детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов**

Детектор УФВ с перестраиваемой длиной волны (*Variable-wavelength UV-vis detector*)

Детектор, измеряющий поглощение на одной длине волны, но, в отличие от детектора с фиксированной длиной волны, оснащённый монохроматором, позволяющим переходить на измерение на других длинах волн λ. Используется источник излучения (лампа), обладающий высокой интенсивностью в требуемом диапазоне λ.

Детектор УФВ с фиксированной длиной волны (*Fixed-wavelength UV-visible detector*)

Детектор, измеряющий поглощение на одной длине волны. Используется источник излучения (лампа) высокой интенсивности на данной длине волны. Переход на другую длину волны требует изменения источника и оптических фильтров.

Диаграмма смешиваемости (*Miscibility chart*)

Двумерная диаграмма, на которой указаны пары не смешивающихся растворителей. Пример см. табл. 9 в Приложении.

Диаметр зерна, d_p (*Particle size*)

Средний диаметр зерна набивки. По одному этому параметру невозможно судить о распределении размеров зёрен.

Диаметр пор (*Pore diameter*)

Средний размер отверстия сорбента. Обычно 30, 60, 90, 120, 300, 500, 1000 или 3000 Å. Чем меньше размер пор, тем больше удельная поверхность материала набивки.

Диапазон (*Range*)

Применительно к методике – промежуток значений концентрации, в котором получаемые результаты имеют требуемые значения точности и сходимости.

Диафрагменный насос (*Diaphragm pump*)

Насос, в котором поршень перемещается в камере, заполненной маслом, закрытой гибкой диафрагмой, в отличие от обычного поршневого насоса, где поршень контактирует с подвижной фазой. Масло и диафрагма сглаживают резкие колебания потока при возвратно-поступательном ходе поршня и позволяют получить весьма стабильный и однородный профиль значений расхода.

Диодно-матричный детектор (*Photodiode array detector*)

Детектор УФ и видимого диапазонов, позволяющий не только контролировать элюирование пиков, но и строить спектральную зависимость поглощения $A(\lambda)$ для каждого из элюируемых компонентов.

Диольная привитая фаза (*Diol bonded phase*)

Нормально-фазный носитель со структурой поверхности Si–O–SiR–CH(OH)CH_2(OH). Имеет полярность, промежуточную между силикагелем и нитрильной привитой фазой.

Диффузия (*Diffusion*)

Процесс перехода компонента из области с более высокой концентрацией в область с более низкой концентрацией, т.е. вдоль градиента концентрации. Определяется термодинамическими факторами. Имеет место в ВЭЖХ, поскольку проба вводится в виде концентрированной зоны в подвижную фазу, в которой вещества пробы до этого не содержались.

Длина цепи (*Chain length*)

В первичной привитой фазе – длина основной углеродной цепи, отходящей от силана (например, бутил, C_4 – длина цепи 4; октил, C_8 – длина цепи 8; октадецил C_{18} – длина цепи 18).

ДМД см. **Диодно-матричный детектор**.

Дозатор: см. **Инжектор**.

Дрейф (*Drift*)

Медленное непрерывное повышение или снижение нулевой линии. Зачастую обусловлен изменением температуры или уравновешиванием системы после небольших изменений состава подвижной фазы.

Ёмкость (*Capacity*)

Наибольшая концентрация анализируемого вещества в пробе, которая может быть введена в колонку для ВЭЖХ без искажения пика из-за перегрузки. Перегрузка может иметь место как в колонке (т.е. искажается изотерма), так и в детекторе (т.е. искажается сигнал).

Живучесть методики: см. **Выносливость методики**

Жидкостно-адсорбционная хроматография (*Liquid-solid chromatography, LSC*)

Способ разделения, при котором используются адсорбция определяемых веществ на немодифицированный сорбент и десорбция с него.

Жидкостно-жидкостная хроматография (*Liquid-liquid chromatography, LLC*)

Способ разделения, в котором на поверхности сорбента имеется слой жидкости, не смешивающейся с подвижной фазой. Удерживание определяемых веществ определяется процессом их переноса между подвижной фазой и адсорбированной неподвижной фазой, а также толщиной слоя жидкости.

ЖХ: сокр. от **Жидкостная хроматография** (*LC*)

Закон Бэра (Бугера-Ламберта-Бэра) (*Beer's law*)

Математическое описание зависимости поглощения от концентрации аналита: $A = \varepsilon bc$, где A – поглощение; ε – молярный коэффициент поглощения аналита, b – длина оптического пути в кювете; c – концентрация аналита в растворе.

Замачивание (*Wetting*)

Процесс уравновешивания поверхности сорбента с подвижной фазой

Застойные области подвижной фазы (*Stagnant mobile phase*)

Подвижная фаза в порах сорбента, которые недостаточно хорошо промываются подвижной фазой.

Защитная колонка (предколонка) (*Guard column*)

Установленная за инжектором короткая колонка, набитая тем же материалом, что и аналитическая. Используется для задержки микрочастиц, сильно удерживаемых или осаждаемых веществ, которые не удалены из пробы до её ввода. Часто называется просто «предколонкой», в отличие от насыщающей предколонки, устанавливаемой до инжектора.

Зернение см.: **Диаметр зерна**.

Изократическое элюирование (*Isocratic elution*)

Режим хроматографического разделения при неизменном составе подвижной фазы. См. также **Градиентное элюирование**.

Изомеры (*Isomers*)

Соединения, химическая формула которых одинакова, однако их строение различается положения из-за различного расположения кратных связей, заместителей в пространстве и пр. Например, орто–, мета- и параaминофенол, а также 1- и 2-хлорпропан – две группы изомеров.

Изотерма адсорбции (*Adsorption isotherm*).

График взаимозависимости между концентрацией компонента на поверхности набивки (C_s, ось y) и в подвижной фазе (C_m, ось x). В идеале уровень концентрации должен быть таким, при котором эта зависимость линейна. Часто встречаются, однако, и нелинейные изотермы, для описания которых разработан ряд математических формул (например, Ленгмюра, Фрейндлиха). Подробнее см. раздел 2.2.

Изотерма Ленгмюра (*Langmuir isotherm*)

Часто встречающееся математическое описание процесса распределения молекул между подвижной и неподвижной фазами. Подробнее см. в разделе 2.2.

Изотерма: см. **Изотерма адсорбции**.

Изоэлектрическая точка, pI (*Isoelectric point*)

Водородный показатель водного раствора, при котором растворимость амфолита минимальна.

Инжектор (*Injector*)

Элемент системы ВЭЖХ, позволяющий вводить фиксированный или переменный объём пробы в поток элюента. При срабатывании инжектора происходит **ввод пробы**.

Инклюзионный объём, V_i (*Inclusion volume*)

В колонке для эксклюзионной хроматографии – общий объём всех доступных пор в носителе и межзёренный объём. Молекулы с молекулярной массой меньше, чем самые большие, которые могут проникать во все поры, элюируются все одновременно. Объём элюента, потраченный для вымывания этих неудерживаемых веществ, называется инклюзионным. Подробнее см. подраздел 2.5 Ж.

Интерфейс для химической ионизации при атмосферном давлении (*Atmospheric-pressure chemical ionization interface, APCI*)

Устройство сопряжения жидкостного хроматографа с масс-спектрометром, совместимое, в отличие от остальных, с величинами расхода, типичными для аналитической работы (до 1,5 мл/мин). Принцип работы интерфейса включает в себя, по меньшей мере три стадии: распылении потока элюента с термическим выпариванием образовавшихся капелек тумана в токе азота; ионизации молекул растворителя в условиях коронного разряда и последующей ионизацией, передачей заряда от ионов растворителя к анализируемым веществам.

APCI принадлежит к группе интерфейсов для ионизации веществ при атмосферном давлении – API (ES, Electrospray): интерфейс где происходит ионизация электростатическим распылением, APPI – интерфейс для фотоионизации при атмосферном давлении и пр.

Ионная сила, μ (*Ionic strength*)

Мера общего количества зарядов в растворе. Ионная сила выражается формулой: $\mu = \sum_i C_i z_i$, где C_i – полярная концентрация i-го иона, z_i – заряд i-го иона.

Ионообменная ёмкость (*Ion-exchange capacity*)

Количество доступных центров для ионного обмена на данном ионообменном материале. Выражается в сухой массе вещества. Обычно имеет значения от 1 до 5 милиграмм-эквивалент на грамм (мг-экв/г).

Ионообменная хроматография (*Ion-exchange chromatography*)

Способ разделения одноимённо заряженных ионов (т.е. катионов или анионов) посредством использования носителя с постоянно привитыми функциональными группами с противоположным зарядом. Два основных варианта ионообменной хроматографии – анионообменная и катионообменная хроматография.

Ион-парная хроматография (*Ion-pair chromatography*)

Способ разделения молекул, несущих заряд. В подвижную фазу вводят противоионы (с помощью ион-парного реагента). Противоионы образуют ионные пары с заряженными частицами определяемых веществ, приводя к образованию нейтральных комплексов. Каждый из таких комплексов имеет разное время удерживания.

Ион-парные реагенты (*PIC reagents*)

Реагенты, используемые для модификации подвижной фазы в ион-парной хроматографии.

ИПХ: см. **Ион-парная хроматография**

Испарительный нефелометрический детектор (*Evaporative light-scattering detector, ELSD*)

Детектор, в котором элюат после выхода колонки распыляется в мелкодисперсный туман. Затем поток тумана проходит через нагреваемую трубку, где объём растворителя вокруг молекул анализируемого компонента уменьшается. В конце трубки растворитель испаряется полностью и образовавшийся из тумана мелкодисперсный аэрозоль определяемого вещества проходит через оптическую ячейку, где

освещается лучом лазера. Появление аэрозоля приводит к рассеянию лазерного монохроматического излучения, которое пропорционально концентрации анализируемого вещества. Детектор пригоден только для анализа слаболетучих и нелетучих веществ.

Кавитация (*Cavitation*)

Образование пузырьков пара в растворе при разрежении. Кавитация проявляется как случайные и невоспроизводимые изменения расхода. Причиной является то, что сапфировый шарик в обратном клапане не садится плотно на седло. Чаще встречается в системах с подвижной фазой низкой вязкости при больших значениях скоростей потока.

Калибровочная кривая (*Calibration curve*)

График зависимости отклика детектора от концентрации анализируемого вещества. В идеале калибровочная кривая обладает следующими свойствами: (1) зависимость величины сигнала от концентрации является прямо пропорциональной (т.е. точки имеют высокий коэффициент линейной корреляции); (2) точки расположены по обе стороны от графика средней величины сигнала, генерируемого при неизвестной концентрации аналита; (3) точки данных распределены равномерно по рабочему диапазону; (4) кривая проходит через начало координат.

Картриджная колонка: см. **Патронная колонка**

Катион (*Cation*)

Атом или молекула, несущие положительный заряд.

Катионный обмен (*Cation exchange*)

Вариант ионообменной хроматографии, в которой поверхность несёт отрицательный заряд. Используется для разделения катионогенных веществ. Привитые к поверхности сульфоновые кислоты образуют носитель с сильными катионообменными свойствами, карбоксиловые кислоты – носитель со слабыми катионообменными свойствами.

Катионообмен: см. **Катионный обмен**

Качественный анализ (*Qualitative analysis*)

Анализ, позволяющий определить наличие или отсутствие того или иного вещества в пробе. Используется при поточных исследованиях.

Количественный анализ (*Quantitative analysis*)

Способ, позволяющий получить значения концентрации определяемого вещества с требуемыми точностью и статистической сходимостью.

Коллектор фракций (*Fraction collector*)

Элемент системы ВЭЖХ, в который собирается элюат после выхода из детектора. Может быть запрограммирован так, чтобы собирать пробу в течение фиксированного времени (т.е. получать фиксированный объём), а также может включаться по сигналу детектора в начале выхода пика и отключаться по окончании выхода пика.

Колонка (*Column*)

Элемент системы ВЭЖХ, содержащий пористый материал, на котором осуществляется разделение смесей веществ, находящихся в растворе.

Колонка Пиркле (*Pirkle column*)

Колонка с набивкой, предназначенной для разделения энантиомеров. Селективность колонки обусловлена привитым к сорбенту высокочистым энантиомером аминокислоты (например, (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицин). Разделение энантиомеров достигается их различным взаимодействием с сорбентом. Это взаимодействие определяется наложением многих типов взаимодействий: образованием водородных связей, π-π, диполь-дипольных и пр.

Колонка-подавитель (*Suppressor column*)

Колонка, изготовленная на основе ионообменного материала, способна нейтрализовать кислоту или основание в подвижной фазе. При кондуктометрическом детектировании основным источником шума является сама подвижная фаза. Поскольку ионы в подвижной фазе принадлежат в основном буферу, использование колонки-подавителя позволяет существенно снизить уровень шума, т.е. повысить отношение сигнал-шум.

Кондуктометрический детектор (*Conductivity detector*)

Детектор, в котором замеряется ток в кювете при приложении переменного потенциала строго определённой амплитуды. Чем более сильный заряд несёт раствор, тем выше удельная электрическая проводимость, соответственно, тем выше сила тока. Единица измерения удельной электрической проводимости – сименс на сантиметр (См/см).

Константа ионизации: см. **Константы кислотно-основной диссоциации**.

Константы кислотно-основной диссоциации K_a или K_b (в логарифмической форме pK_a и pK_b) (*Acid-base dissociation constants*).

Константы, входящие в следующие общие химические уравнения:

HA ⇆ +A– (для кислот) и B+H2O⇆BH++OH– (для оснований),

а также Ka = [H+][A–]/[HA] и Kb = [BH][OH–]/[B]

Концевые фитинги (*Endfitting*)

Уплотнения по концам колонки для ВЭЖХ, с помощью которых она присоединяется к трубопроводам, идущим от инжектора и к детектору.

Коэффициент асимметрии (*Asymmetry factor*)

Показатель того, насколько форма пика отличается от теоретической – кривой распределения Гаусса. Подробно о расчёте коэффициента асимметрии см. раздел 2.1.

Коэффициент диффузии, *D* (*Diffusion coefficient*)

Параметр, описывающий скорость диффузии молекул в данной системе. Коэффициент диффузии зависит от состава элюента, температуры системы и размера молекул компонента. Для малых молекул в условиях ВЭЖХ типичное значение составляет около 5×10^{-6} см^2/с. Для носителей с привитыми фазами имеются отдельные коэффициенты диффузии для подвижной фазы, D_m, и для неподвижной фазы, D_s.

Коэффициент ёмкости, k' (*Capacity factor*)

Параметр, используемый для описания удерживания анализируемого вещества в колонке. Подробно см. раздел 2.2.

Коэффициент отклика (*Response factor*)

Отношение величины отклика детектора к концентрации определяемого вещества.

Коэффициент разделения, α (*Separation factor*)

Отношение коэффициентов ёмкости для двух соседних пиков, указывающее, насколько пики разделены. Подробнее см. раздел 2.2.

Коэффициент распределения, *K* (*Partition coefficient*)

Числовое выражение термодинамического равновесия определяемого вещества между подвижной фазой и сорбентом. Состояние равновесия описывается выражением $A_{mp} = A_{sorb}$, где A_{mp} – содержание определяемого вещества в подвижной фазе, A_{sorb} – в сорбенте. $K = [A]_{mp}/[A]_{sorb}$.

Кулонметрический детектор (*Coulometric detector*)

Детектор, основанный на измерении силы тока при полном окислении или восстановлении аналита на его поверхности. От **амперметриче-**

ского детектора отличается степенью полноты реакции. Измеряемый параметр – сила тока в амперах.

Лигандообменная хроматография (*Ligand-exchange chromatography*)

Способ разделения энантиомеров посредством комплексообразования с переходным металлом (например, Cu^{+2}) с использованием чистого энантиомера аминокислоты (например, D-пролина) в подвижной фазе. Зачастую используется с обращённо-фазными колонками (например, C_{18}). Разделение происходит за счёт дифференцированного взаимодействия диастереомеров хелатных комплексов с поверхностью.

Линейная скорость, *u* (*Linear velocity*)

Скорость прохождения подвижной фазы через колонку (см/с). Отличие линейной скорости от объёмного расхода в том, что линейная скорость зависит от диаметра колонки, размера и пористости зёрен материала набивки, плотности набивки, тогда как объёмный расход от этих параметров не зависит.

Линейный диапазон методики (*Linerarity*)

Диапазон сигнала детектора, в котором его отклик находится в прямой пропорциональной зависимости от концентрации анализируемого вещества. Обычно линейность представляют в виде изменчивости наклона регрессионной зависимости (r^2). При статистически точной линейной корреляции r^2 равно единице. Для важных случаев количественного определения зачастую требуется, чтобы r^2 было не менее 0,99.

Линейный диапазон см.: **Диапазон**.

Максимальное количество пиков, η (*Peak capacity*)

Наибольшее количество компонентов, которые могут быть разделены при заданных максимальном значении k' и минимальном значении R_s. Максимальное количество пиков тем больше, чем выше эффективность колонки N. Значение η при $R_s = 1{,}0$ выражается следующим

$$\eta = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4}\ln(1 + k')$$

образом:

Манжета: см. **Ферула**

Массоперенос (*Mass transfer*)

Процесс перемещения молекул между фазами, например, из подвижной фазы на сорбент и обратно. Термин «массоперенос» может также встречаться при описании перемещения определяемого вещества на привитую фазу (или адсорбированную жидкую фазу), если нагрузка по привитой фазе достаточно высока.

Материал набивки имеющий несферическую форму частиц (*Irregular packing material*)

Материал набивки, полученный посредством помола и рассеивания на ситах; в результате зёрна имеют неправильную форму.

Межзёренный объём (*Interparticle volume*)

Объём внутри колонки, но вне материала носителя.

Металлофильное взаимодействие (*Metallophilic interactions*)

Взаимодействие молекулы определяемого вещества с остаточными примесными ионами металла в матрице носителя.

Механизм удерживания (*Retention mechanism*)

Процесс, обусловливающий распределение определяемого вещества между подвижной и неподвижной фазами (например, гидрофобные, силанофильные или металлофильные взаимодействия).

Микроколонка для ВЭЖХ (*Microbore HPLC column*)

Колонка внутренним диаметром до 1,0 мм, обычно длиной от 30 до 300 мм.

Мицеллярная хроматография (*Micellar chromatography*)

Хроматография, в которой в качестве модификатора подвижной фазы используются мицеллы, что даёт возможность получать уникальные разделения, подобно тому, как это происходит при использовании ион-парных реагентов.

Мицелла (*Micelle*)

Сферическое расположение молекул, имеющих небольшую высокополярную или заряженную «головку» и длинный неполярный «хвост». В водных растворах такие молекулы ориентируются таким образом, что неполярные «хвосты» (гидрофобные части) направлены к центру сферы, а заряженные или полярные «головки» – к периферии, и именно они взаимодействуют с полярным растворителем.

Мономерная привитая фаза (*Monomeric bonded phase*)

Привитая фаза, полученная с помощью реагента, в котором имеется только одна реакционноспособная группа (например, хлордиметилалкилсилана). Как только реактив прореагировал с поверхностью носителя, больше в соответствующем центре реакций не происходит.

Набивка (*Packing material*)

Вещество, нерастворимое в подвижной фазе и обладающее высокоразвитой поверхностью, помещаемое в трубку колонки. После упаковки в колонку именно на поверхности этого вещества происходит разделение в хроматографическом опыте. Синонимы: сорбент, неподвижная фаза, уплотнённый слой.

Набухание (*Swelling*)

Впитывание жидкости твердыми веществами, приводящее к увеличению их первоначального объема. Имеет место, в частности для некоторых органических полимерных абсорбентов в процессе их уравновешивания с подвижной фазой. Является причиной изменения геометрии частиц сорбента. Обратный процесс выведения растворителя из твердых веществ приводит к уменьшению их объёма, называется *усадкой*. Для получения воспроизводимых результатов перед вводом пробы адсорбент должен быть уравновешен с элюентом.

Насыщенный раствор (*Saturated solution*)

Растворитель, содержащий максимальное количество растворённого вещества, свыше которого оно перестаёт растворяться (или, в более общем виде, начинает образовывать вторую фазу).

Насыщающая предколонка (*Precolumn*)

Колонка, установленная между насосом и инжектором. Эта колонка – расходная, предназначенная для насыщения подвижной фазы растворённым материалом набивки прежде, чем подвижная фаза попадает в более дорогостоящую аналитическую колонку. Предколонку набивают материалом *того же типа*, что аналитическую (например, октилсиликагелем), но более крупнозернистым и пористым и более дешёвым (например, от 40 до 60 мкм).

Неподвижная фаза (*Stationary phase*)

Часть набивки, химически связанная с сорбентом или физически адсорбированная им.

Непористые частицы (*Nonporous*)

Сплошные по всей толщине до поверхности частицы носителя.

Непрямое детектирование: см. **Ваканто-хроматография**

Несмешиваемость (*Immiscible*)

Термин, используемый для описания двух жидкостей, которые в равновесном состоянии после смешения образуют две фазы.

Несоответствие (*Mismatch*)

Условия, при которых состав растворителя, используемого при пробоподготовке, не совпадает с составом подвижной фазы.

Номер сита (*Mesh size*)

Соответствует размеру ячейки сита. При рассеивании на ситах сорбента получают фракции, пропуская исходное сырьё последовательно через ряд сит. Чем больше ячеек сита приходится на единицу длины (в англоязычной литературе для обозначения номера сита используется единица *меш*, число ячеек на один дюйм), тем меньше расстояние между центрами ячеек и тем более мелкие частицы проходят сквозь это сито.

Номограмма (*Nomogram*)

Представление данных в линейно-графической форме. В ЖХ используется для визуального сравнения силы смесей растворителей, используемых в жидкостно-адсорбционной хроматографии.

Нормально-фазная хроматография (*Normal-phase chromatography*)

Система, в которой носитель является полярным, а подвижная фаза – неполярной или менее полярной.

Нулевая линия (*Baseline*)

Хроматограмма, получаемая в полностью уравновешенной системе, когда отклик детектора обусловлен только движением подвижной фазы. Высота и площадь пиков и другие хроматографические параметры, определяемые профилем элюирования (асимметрия, число теоретических тарелок и пр.) зависят от характера нулевой линии.

Обжимная втулка: см. **Ферула**

Образование «хвостов»: см. **Удлинение ниспадающей части пика**

Обратный клапан (*Check valve*)

Элемент насоса, благодаря которому подвижная фаза перемещается в направлении от резервуара с элюентом через колонку в детектор, но не обратно. Подробно описан в разделе 1.1.

Обращение потока (*Backflush*)

Употребляется применительно к удалению из колонки компонентов, сильно связываемых в головной её части.

(1) Переключение направления потока элюента в колонке после адсорбции анализируемого вещества имеющего сильное сродство к поверхности. Таким образом это вещество вымывается из колонки в детектор или на вход другой колонки. Использование этого приёма устраняет необходимость значительного увеличения времени анализа.

(2) Поток растворителя, используемый для удаления веществ, осаждённых во входной фритте или головной части колонки. Здесь элюат направляют прямо в ёмкость для отработанных веществ, чтобы предотвратить загрязнение детектора.

Обращённо-фазная хроматография (*Reversed-phase chromatography, RPC*)

Хроматографическая система, в которой сорбент является неполярным, а подвижная фаза – более полярной.

Общий объём проникновения, V_p (*Total permeation volume*)

В эксклюзионной хроматографии – суммарный объём в колонке с учётом как пор, так и межзёренного пространства.

Объём неудерживаемого компонента, V_o (*Void volume*)

Объём элюента, требуемый для переноса неудерживаемого компонента от инжектора до детектора. $V_0 = t_0F$, где t_0 – время выхода неудерживаемого компонента, F – объёмный расход.

Объём пор (*Pore volume*)

Часть объёма колонки, обусловленная порами в сорбенте.

Объём удерживания (элюирования), V_r (*Elution volume*)

Объём подвижной фазы, необходимый, чтобы донести определяемое вещество от инжектора до детектора. Рассчитывается по времени удерживания t_r и объёмному расходу F: $V_r = t_r \times F$.

Окись циркония (*Zirconia*)

Сорбент на неорганической основе ZrO_2.

Оконная диаграмма (*Window diagram*)

Способ оптимизации разделения, в котором разрешение для всех пар определяемых веществ отображается в виде графика зависимости от варьируемого параметра. Подробнее см. раздел 2.3.

Окись алюминия (*Alumina*)

Адсорбент с общей химической формулой Al_2O_3, устойчивый к воздействию подвижных фаз в широком диапазоне pH. В процессе производства свойства окиси алюминия можно изменять так, чтобы водная суспензия в результате была основной (катионообменный адсорбент), кислой (анионообменный адсорбент) или нейтральной (общая адсорбционная хроматография).

Окись кремния (*Silica*)

Чаще всего используемый в ВЭЖХ сорбент: SiO_2.

Октадецильная привитая фаза (*Octadecyl bonded phase*)

Обращённо-фазный носитель со структурой поверхности $Si–O–SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$ – C_{18}.

Октильная привитая фаза (*Octyl bonded phase*)

Обращённо-фазный носитель со структурой поверхности $Si–O–SiCH_2(CH_2)_6CH_3$.

Определение удельной площади поверхности по методу БЭТ (*BET surface area determination*)

Метод Брунауэра, Эммета и Теллера; используется для определения удельной площади поверхности пористых материалов по изотерме адсорбции азота при –196º С.

Определяемое вещество (*Solute*)

Компонент пробы, подлежащий качественному или количественному определению, растворённый в соответствующем растворителе.

Оптимизация (*Optimization*)

Процесс при разработке методики, направленный на достижение наименьших продолжительности анализа и затрат и, в то же время, достаточных разрешения и эффективности.

Отношение сигнал-шум, *S*/*N* (*Signal-to-noise ratio*)

Отношение значения высоты пика аналита к значению фонового шума системы. Зачастую для методики определяются минимальное отношение *S*/*N* и экспериментально определённый на его основе предел обнаружения. Подробнее см. раздел 2.4.

Параметр полярности растворителя, *P*' (*Solvent polarity parameter*)

Параметр, рассчитываемый на основании экспериментальных данных, связанный с удерживанием соединения в двух разных подвижных фазах (в данном случае чистых растворителях):

$$\frac{k'_{sol_2}}{k'_{sol_1}} = 10^{(P_2 - P_1)/2}$$

где k'_{solv1} и k'_{solv2} описывают удерживание в подвижных фазах 1 и 2, а P_1 и P_2 представляют собой параметры полярности.

Параметр силы растворителя (*Solvent strength parameter*)

Любой из ряда параметров, описывающих способность растворителей или подвижных фаз к элюированию. К такого рода параметрам относятся элюотропная сила ε^0 и параметр полярности *P*' растворителя. См. табл. 5 в Приложении.

Параметры пика (*Moments*)

Математические выражения, описывающие площадь пика, его ширину, время удерживания и т.д. Подробнее см. раздел 2.2.

Парно-ионная хроматография (*Paired-ion chromatography*) см.: **Ион-парная хроматография**.

Патронная колонка (*Cartridge column*)

Конструкция колонки со съёмными концевыми фитингами многократного использования. Зачастую трубка колонки имеет резьбу, на которую непосредственно навинчиваются фитинги. В другой конструкции патрон вставлен в держатель. Фитинги навинчиваются на держатель так, что колонка находится внутри. В обоих случаях расходным материалом является собственно патронная колонка.

Перегрузка (*Overload*)

(1) *Перегрузка колонки* имеет место, когда количество молекул определяемого вещества во введённой пробе превышает количество

имеющихся центров адсорбции, так что изотерма адсорбции становится нелинейной.

(2) *Перегрузка по объёму пробы* имеет место, когда введённая проба имеет объём, превышающий возможности системы (сопоставимый с объёмом колонки).

(3) *Перегрузка детектора* имеет место, когда сигнал пробы (выше определённой концентрации) насыщает детектор (величина сигнала оказывается в нелинейной области детектора).

Переключение колонок (*Column switching*)

Приём, используемый для улучшения разделения за счёт селективного элюирования разных классов соединений из колонки, находящейся раньше по ходу потока (колонка 1), на колонку, находящуюся позже по ходу потока (колонка 2). Как только искомые соединения выходят из колонки 1, поток подвижной фазы переключается так, чтобы обходить колонку 1 и поступать в колонку 2, где происходит разделение. Процесс выключения колонки 1 из потока подвижной фазы и повторного включения в поток может быть многократным.

Перепад давления (*Backpressure*)

Значение давления на входе в колонку. Зависит почти от всех параметров системы, в частности: состава подвижной фазы, расхода, типа колонки и температуры.

Петля-дозатор (*Injector loop*)

Деталь **инжектора**, содержащая заданный объём пробы. Заполняется перед **вводом пробы**.

Пик (*Peak*)

Форма сигнала, генерируемого детектором при прохождении через него хроматографической зоны определяемого вещества.

Пик-призрак (*Ghost peak*)

Пик, появляющийся на хроматограмме случайным и невоспроизводимым образом.

Плунжер см.: **Поршень**.

Поверхностно-пористый (*Pellicular*)

Материал носителя со сплошной сферической сердцевиной и тонким пористым поверхностным слоем.

Подавление ионов (*Ion suppression*)

Добавление в подвижную фазу буфера, с целью предотвращения приобретения заряда молекулами определяемых веществ в процессе элюирования.

Показатель преломления, *n* (*Refractive index*)

Отношение скорости света в вакууме к скорости света в данном веществе. Степень отклонения светового луча при прохождении границы раздела фаз зависит от угла падения и отношения показателей преломления этих фаз. Это явление описывает закон Снелля: $n_1 \sin \varphi_1 = n_2 \sin \varphi_2$, где n_1 и n_2 – показатели преломления фаз 1 и 2, φ_1 – направление луча при падении на границу раздела, φ_2 – направление луча после прохождения границы раздела. Показатель преломления весьма сильно зависит от температуры.

Полимерная привитая фаза (*Polymeric bonded phase*)

Привитая фаза со слоистой структурой на поверхности сорбента, полученная с использованием в качестве дериватизирующих реактивов ди- или трихлорсилана. Такие фазы зачастую более устойчивы, чем соответствующие мономерные, однако столь же часто их использование приводит к недопустимому размыванию пиков соединений с большой молекулярной массой из-за значительного массопереноса. Вследствие того, что процесс дериватизации при получении полимерных привитых фаз является многоступенчатым, разброс характеристик полимерных носителей от партии к партии больше, чем соответствующих мономерных.

Политетрафторэтилен (ПТФЭ, фторопласт, тефлон®) [*Polytetrafluoroethylene, PTFE, Teflon®*)

Химически инертная пластическая масса, чаще всего используемая в соединениях резервуара с насосом и детектора с ёмкостью для отработанного элюата. Проницаем для кислорода.

Полость (*Void*)

Часть объёма колонки, заполненная подвижной фазой, в которой отсутствует набивка. Образуется по мере старения колонки из-за уплотнения или растворения материала набивки. Обычно полость возникает в головной части колонки, где перепад давления выше всего. Наличие полостей приводит к резкому удлинению ниспадающей части пика и даже расщеплению пиков.

Полупрепаративная хроматография (*Semipreparative chromatography*)

Способ разделения и накопления веществ в небольших количествах после их однократного ввода в колонку. Все параметры системы имеют несколько большие размеры, чем в аналитической хроматографии: размер колонки, зернение материала набивки, вводимые объём и масса, расход, объём кюветы детектора. Полупрепаративная хроматография зачастую служит предварительным этапом для дальнейшего перехода к ещё большим масштабам – препаративной хроматографии.

Получение производных (*Derivatization*)

(1) Процесс химического модифицирования поверхности сорбента. Применительно к оксиду кремния осуществляется обычно с помощью хлорзамещённых алкилсиланов. Если оконечные функциональные группы способны вступать в реакцию с самим хлорзамещённым силаном (например, амино- или цианогруппы), вместо него используется алкоксисилан.

(2) Процесс химического изменения анализируемого вещества с целью: (а) повышения специфичности детектирования (например, за счёт получения флуоресцирующего производного); (б) снижения предела обнаружения за счёт повышения отклика детектора на производное соединение.

Пористость, ε (*Porosity*)

В поперечном сечении колонки, набитой непористым материалом, под пористостью понимают объём, не занятый набивкой. Для пористых материалов пористость включает также объём доступных пор.

Поршень (плунжер) (*Piston*)

Элемент насоса, обычно выполненный из сапфирового стержня, обеспечивающий принудительное перемещение элюента в системе.

Поршневое уплотнение (уплотнение плунжера) (*Piston seal*)

Специальное кольцо, образующее с поверхностью поршня герметичное соединение.

Послеколоночная дериватизация см.: **Постколоночная дериватизация**.

Постколоночная дериватизация (*Post-column derivatization*)

Процесс, в котором определяемое вещество подвергается химическим преобразованиям после элюирования из колонки до входа в детектор, с

целью повышения специфичности или снижения предела обнаружения.

Постоянная времени, τ (*Time constant*)

Мера скорости отклика детектора на изменения сигнала, обусловленные элюированием компонента пробы.

Предел количественного определения [(*Limit of quantitation* (*LOQ*); *Quantitation limit*]

Наименьшая концентрация аналита, которую можно определить с требуемыми точностью и сходимостью. Для этого требуется точно задать допустимое отношение сигнал-шум (например, $S/N \geq 10$).

Предел обнаружения (*Detection limit, d.l., LOD*)

Наименьшая концентрация анализируемого вещества, которая может быть обнаружена. Надёжные количественные результаты на этом уровне получены быть не могут. Подробнее см. раздел 2.5.

Предел эксклюзии (*Exclusion limit*)

В эксклюзионной хроматографии – молекулярная масса, свыше которой определяемое вещество не проникает в поры набивки. Объём элюирования всех веществ с молекулярной массой не меньше предела эксклюзии одинаков и равен **эксклюзионному объёму**, V_e. Подробнее см. подраздел 2.5 Ж.

Препаративная хроматография (*Preparative chromatography*)

Способ разделения и накопления в больших количествах веществ после однократного ввода в колонку. Все параметры системы имеют значительно большие размеры, чем в аналитической хроматографии: размер колонки, зернение материала набивки, вводимые объём и масса, расход, объём кюветы детектора.

Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, *h* (*Reduced plate height*)

Отношение высоты, эквивалентной теоретической тарелке, *H*, к диаметру зерна, d_p: $h = H / d_p$. Безразмерный показатель качества набивки колонки и оптимизации системы. Приемлемыми обычно считают значения менее 4. Меньшие значение *h* говорят о более высокой эффективности колонки.

Приведенная скорость, v (*Reduced velocity*)

Безразмерный параметр, зависящий от линейной скорости потока: $v = ud_p / D_m$, где u – линейная скорость потока, d_p – диаметр зерна, D_m – коэффициент диффузии подвижной фазы.

Приведенное время удерживания, t_r' (*Adjusted retention time*)

Время удерживания определяемого вещества при неизменной совокупности хроматографических параметров (например, состав подвижной фазы, тип колонки, температура). Рассчитывается как разность времени удерживания t_r, и времени удерживания несорбирующегося компонента, t_0. Используется для расчёта коэффициента ёмкости $k'=(t_r-t_0)/t_0=t_r'/t_0$.

Привитая фаза (*Bonded phase*)

При модифицировании поверхности носителя образуются ковалентные связи между материалом носителя и дериватизирующим реагентом с образованием привитой фазы. Привитые фазы используются для получения носителей с широким спектром химических и физических свойств. Типичными привитыми фазами являются октадецил, цианопропил и октил.

Привитофазная хроматография (*Bonded phase chromatography*)

Разделение на носителях, модифицированных химическими связанными функциональными группами. Если привитая фаза полярная (например, диольная, аминная, циановая), такой носитель называют нормально-фазным, если неполярная (например, алкильная, фенильная) – обращённо-фазным.

Привитые фазы с отпечатками молекул (*Molecular-imprinted bonded phases*)

Благодаря особым приёмам синтеза реализуют т.н. «отпечатки молекул», т.е. молекулы, имеющие трёхмерные полости, соответствующие размеру и форме одной конкретной молекуле. Такие полости присоединяют к сорбенту, получая носитель с чрезвычайно высокой специфичностью к соответствующему определяемому веществу.

Проба (*Sample*)

(1) Материал, содержащий определяемые вещества.

(2) Раствор, готовый к вводу в систему ВЭЖХ, содержащий определяемые вещества.

Пробоподготовка (*Sample preparation*)

Все операции, необходимые для подготовки пробы к анализу. Могут быть как простыми (например, разбавление), так и сложными (получение химических производных, экстрагирование, вытяжка растворителем).

Продольная диффузия (*Longitudinal diffusion*)

Молекулярная диффузия в направлении потока подвижной фазы. Этот процесс приводит к размытию зоны, т.е. к снижению эффективности колонки.

Проницаемость, *K* (*Permeability*)

Мера качества колонки, учитывающая как материал, так и способ набивки. Высокая проницаемость говорит о том, что колонка набита плохо (имеет большой межзёренный объём), слишком низкая – о повышенной вероятности забивания колонки, трубопроводов или других элементов системы.

Проточный лазерный нефелометрический детектор.

Low-angle laser light-scattering detector, LALLS. Или Evaporative Light Scattering Detector – ELSD.

Проходной фильтр (*In-line filter*)

Элемент, устанавливаемый после насоса (или предколонки, если она имеется) перед инжектором. Удаляет частицы, образующиеся в растворителе, насосе или предколонке.

ПТФЭ см.: **Политетрафторэтилен**.

ПЭЭК (*PEEK*)

Полиэфирэфиркетон. Пластмасса, из которой сейчас изготавливают ряд элементов систем ВЭЖХ: петли инжекторов, соединительные трубки, гайки и обжимные втулки, трубки колонок и концевые фитинги.

Пыль (*Fines*)

Частицы сорбента, остающиеся в процессе производства, имеющие значительно меньшие размеры, чем средний размер частицы готового продукта. Пыль также может образоваться в колонке для ВЭЖХ вследствие длительной эксплуатации под высоким давлением, характерным для условий ВЭЖХ.

Разделение (*Separation*)

Процесс, в котором для двух определяемых веществ достигаются два различных времени элюирования.

Размытие в осевом направлении (*Axial diffusion or dispersion*)

Размытие хроматографической зоны из-за диффузии компонента в осевом направлении колонки от центра масс пика.

Размытие зоны (*Band broadening*)

Размытие хроматографической зоны компонента, имеющее место при увеличении времени элюирования, поскольку при разделении компонент пробы проводит часть времени, взаимодействуя с носителем, а часть – в растворённом в подвижной фазе виде. Размытию способствуют диффузия и массоперенос, как в подвижной фазе, так и в носителе и на его поверхности.

Разрешение, *R* (*Resolution*)

Мера качества разделения двух соседних пиков. Подробнее см. раздел 2.2.

Распределение Гаусса (*Gaussian curve*)

График нормального распределения, используемый для оценки профиля элюирования хроматографического пика.

Распределение размеров зёрен (*Particle size distribution*)

Частотное распределение зёрен по диаметру. При маркировке колонки, например, «5 мкм» 90 % зёрен имеют диаметр в пределах от 3,5 до 6 мкм. Чем меньше разброс размеров зёрен, тем выше эффективность колонки.

Растворимость (*Solubility*)

Наибольшая концентрация данного компонента в данном растворителе. Если предел растворимостьи превышен, образуется двухфазная система, компонент является нерастворимым (если это твёрдое вещество) в растворителе или несмешиваемым с ним (если это жидкость).

Растворитель (*Solvent*)

В ВЭЖХ – жидкость, используемая для растворения пробы, либо для приготовления **элюента**.

Расход объёмный (*Flow rate*)

Скорость прохождения подвижной фазы в системе, измеряемая как объём в единицу времени (например, мл/мин или мкл/мин).

Резервуар (*Reservoir*)

Элемент хроматографа, предназначенный для обеспечения сохранности элюента перед использованием в качестве подвижной фазы.

Рефрактометрический детектор (*Refractive index detector*)

Детектор, принцип действия которого основан на измерении показателя преломления в потоке. Представляет собой «универсальный» детектор, однако характеризуется относительно малой чувствительностью и возможностью работы исключительно для изократических разделений.

Робастность: см. **Устойчивость**

Селективность (*Selectivity*)

Способность сочетания колонка–подвижная фаза разделить заданный набор определяемых веществ. Обычно термин используется в узком смысле – применительно к соединениям одного класса, например, фенольных, флавоноидов или лигнанов.

Сжимаемость (*Compressibility*)

Степень изменения объёма растворителя под действием давления. Прецизионные насосные системы должны предусматривать компенсацию сжимаемости, чтобы обеспечивать постоянство расхода.

Сила элюента (*Solvent strength*)

Мера способности элюента вымывать растворённые вещества из колонки, зависящая от полярности элюента, а также от свойств других веществ, растворённых в нём. В качестве элюента может применяться и чистый растворитель В пределах данного ряда *слабые элюенты* дают в среднем самые большие времена элюирования, *сильные* – самые малые.

Силанольная группа (*Silanol group*)

Оконечная функциональная группа на поверхности силикагеля: Si–OH.

Силанофильные взаимодействия (*Silanophilic interactions*)

Относительно сильные взаимодействия с образованием водородных связей определяемого вещества с поверхностными силанольными

группами. Зачастую является главной причиной размывания пиков основных аминосоединений.

Силилирование (*Silylation*)

Процесс дериватизации, в котором для получения производных используется реакционноспособный замещённый силан.

Силоксан (*Siloxane*)

Кислородная связь между соседними молекулами кремния: Si–O–Si.

Сильный анионит [*SAX* (*strong anion-exchange material*)]

Нерастворимое в элюенте вещество с сильными анионообменными свойствами. Поверхность несёт положительный заряд.

Сильный катионит [*SCX* (*strong cation-exchange material*)]

Нерастворимое в элюенте вещество с сильными катионообменными свойствами. Поверхность несёт отрицательный заряд.

Системный пик (*System peak*)

В ион-парной хроматографии – обогащённая или обеднённая зона, возникающая при нарушении равновесия ион-парного реагента с поверхностью.

Слабый анионит [*Weak anion-exchange material* (*WAX*)]

Нерастворимое в элюенте вещество со слабыми анионообменными свойствами. Поверхность несёт положительный заряд.

Слабый катионит [*Weak cation-exchange material* (*WCX*)]

Нерастворимое в элюенте вещество со слабыми катионообменными свойствами. Поверхность несёт отрицательный заряд.

Смешанные материалы набивки и колонки (*Mixed-mode packing materials and columns*)

Колонки, содержащие смесь двух или более материалов набивки (например, амино- и октилсиликагель) или носитель, к поверхности которого привиты функциональные группы более, чем одного типа (в этом случае дериватизация осуществляется в несколько этапов).

Смешиваемость (*Miscibility*)

Свойство двух растворителей (элюентов) образовывать в смеси однофазную систему в равновесном состоянии независимо от долей каждого из них.

Смешиваемые жидкости (*Miscible*)

Термин, используемый для обозначения пары жидкостей, образующих в смеси однофазную систему в равновесном состоянии независимо от долей каждой. Следует обратить внимание на то, что понятия «частично смешиваемые» не существует. См. также **Растворимость**.

Совместимый с биологическими веществами (*Biocompatible*)

Не вызывающий денатурирования или необратимой адсорбции белков. Примеры материалов такого рода – титан и ПЭЭК, в отличие от некоторых материалов, широко используемых для изготовления элементов системы ВЭЖХ (нержавеющей стали фритт и трубок), а также материалов набивки, активно реагирующих с белками и пептидами.

Соединительные трубки (*Connection tubing*)

Детали, с помощью которых создаётся непрерывный путь потока между различными элементами системы ВЭЖХ. Трубки могут быть изготовлены из фторопласта и иметь относительно большой внутренний диаметр [3,18 мм (1/8 дюйма)] – для соединения резервуара с насосом и детектора с ёмкостью для отработанного элюата); капилляры из нержавеющей стали среднего диаметра (внутренний диаметр от 0,51 мм (0,02 дюйма) до 1,02 мм (0,04 дюйма) – для соединения насоса с инжектором); из нержавеющей стали или ПЭЭК малого диаметра (внутренний диаметр от 0,13 мм (0,005 дюйма) до 0,25 мм (0,01 дюйма) – для соединения инжектора с колонкой и колонки с детектором). См. **Трубопроводы**.

Сольвофобные взаимодействия (*Solvophobic interactions*)

Чтобы перейти в раствор, молекула компонента пробы должна создать полость молекулярных размеров в подвижной фазе. Для этого нужна энергия. Следовательно, движущей силой перехода компонента из подвижной фазы на поверхность является восстановление когезионной структуры подвижной фазы и более предпочтительное взаимодействие компонента с сорбентом. Таким образом, молекула компонента выводится из растворителя за счёт сольвофобного взаимодействия.

Содержание углерода, %C (*Carbon load*)

Количество углерода, химически связанного с материалом носителя, выраженное как массовая доля в процентах. Для алкильных привитых фаз нагрузка может варьировать от 3 % (например, для триметила) до свыше 20 % (для C_{22} или полимерных фаз).

Специфичность (*Specificity*)

Способность методики повторяющимся образом определять концентрацию одного аналита в присутствии других компонентов в матрице пробы. Специфичность достигается за счёт полного разрешения пика определяемого вещества с другими (это называется хроматографической специфичностью) или за счёт специфичности детектора, например, если определяемое вещество обладает свойством флуоресценции, а побочные вещества – нет.

Стеночные эффекты (*Wall effects*)

Наличие каналов с большей скоростью потока у стенок колонки, приводит к увеличению размытия пика. Обычно уплотнённый слой в пристеночной области менее плотен и однороден, чем в остальной части объёма колонки.

Степень покрытия (*Coverage*)

Количество привитой фазы на поверхности носителя. Степень покрытия может выражаться либо как массовая доля в процентах (например, **содержание углерода**), либо как количество покрытых реакционных центров на единицу поверхности (мкМ/м^2). Хотя степень покрытия зависит от размера молекул вещества, прививаемого к поверхности, обычно наибольшее её значение – от 30 % до 60 % от всех имеющихся на поверхности реакционных центров.

Суспензия (*Slurry*)

Взвесь твёрдых частиц в жидкости. Чтобы эффективно перенести насыпной материал набивки, имеющий микронные размеры, в колонку, нужны особые условия. Материал набивки переводят в форму суспензии в растворителе (называемом суспензиеобразующим). Соответствующий процесс называют мокрой или суспензионной набивкой колонки. Камеру с суспензией присоединяют к пустой трубке колонки, после чего суспензию резко под большим давлением подают в колонку.

Сходимость (*Precision*)

Мера способности методики воспроизводимым образом давать сходные результаты для одной и той же пробы. Высокая сходимость не означает, что полученные результаты корректны. См. также **Точность**.

Твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ) (*Solid-phase microextraction*, *SPME*)

Способ очистки и концентрирования пробы до анализа с помощью волокна, абсорбирующего пробу. Проба десорбируется прямо в колонку или экстрагируется с волока растворителем для пробы и затем подвергается анализу.

Твердофазная экстракция (ТФЭ) (*Solid-phase extraction, SPE*

Приём пробоподготовки, в котором для предварительного разделения пробы используется крупнозернистый сорбент, обычно в полипропиленовых трубках. Таким образом до анализа удаляются возможные побочные вещества, микрочастицы и вещества, способные к осаждению. Кроме того, удаётся эффективно уменьшить объём вводимой пробы, благодаря чему общая чувствительность методики повышается на порядки, по сравнению с вводом неподготовленной пробы.

Температура вспышки (*Flash point*)

Температура, при которой пары растворителя над поверхностью воспламеняются. Значения температур вспышки приведены в табл. 8 в Приложении.

Тефлон® см.: **Политетрафторэтилен**.

Титан (*Titanium*)

Материал, используемый вместо нержавеющей стали в случаях, когда требуется лучшая **совместимость с биологическими веществами**. Серийно выпускаются титановые трубки и фритты.

Тонкая колонка для ВЭЖХ (*Narrow-bore HPLC column*)

Колонка, геометрические размеры которой занимают промежуточное положение между аналитической и микроколонкой: длина – от 50 до 250 см, внутренний диаметр – от 1,0 до 2,5 мм.

Точность (*Accuracy*)

Показатель того, насколько близкие результаты даёт методика к ожидаемым или известным. См. **Сходимость**.

Треугольник оптимизации элюента (*Solvent optimization triangle*)

Ускоренный способ проверки множества различных растворителей и их смесей при оптимизации методики. Подробнее см. раздел 2.3.

Треугольник селективности (*Selectivity triangle*)

Объединение растворителей в классы посредством нанесения их на сетчатую треугольную диаграмму в соответствии с их общей способностью выступать акцепторами водородных связей, донорами водородных связей или проявлять способность к дипольному взаимодействию. Подробнее см. раздел 2.3.Б.

Трубка колонки (*Column tubing*)

Отрезок трубки из нержавеющей стали (реже титана и ПЭЭК), имеющий точное (калиброванное) значение внутреннего диаметра и полированную внутреннюю поверхность, а также точное значение длины.

Трубопроводы (*Tubing*)

Элементы соединения в системах ВЭЖХ. Выпускаются разных внутренних диаметров [от 0,102 мм (0,004 дюйма) до 1,27 мм (0,05 дюйма)], изготавливаются из различных материалов (фторопласт, нержавеющая сталь, ПЭЭК).

ТФМЭ: см. **Твердофазная микроэкстракция**

ТФЭ: см. **Твердофазная экстракция**

Удельная поверхность (*Surface area*)

Общая доступная площадь поверхность материала набивки, выраженная в квадратных метрах на грамм. Удельная поверхность обратно пропорциональна диаметру пор.

Удерживание (*Retention*)

Результат взаимодействия определяемых веществ с неподвижной фазой в процессе хроматографического разделения. Если вещество остаётся связанным с неподвижной фазой дольше, его пик на хроматограмме появляется позже, поэтому говорят о его более сильном удерживании.

Удлинение ниспадающей части пика (*Tailing*)

Форма пика, элюируемого из колонки, при которой центр его масс находится за максимумом. Появление «хвостов» соответствует значениям коэффициента асимметрии > 1.

Удлинение фронта пика (*Fronting*)

Форма пика, элюируемого из колонки, при которой центр его масс находится до максимума. Удлинение фронта пика соответствует значениям коэффициента асимметрии < 1.

Универсальный фитинг (*Universal fitting*)

Цельный блок гайка–манжета, обычно из деформируемой пластмассы (например, ПЭЭК или ацетальвинипласта). Фитинг образует соединение трубки с муфтой и допускает многократное использование. Единственный недостаток пластмассы по сравнению с нержавеющей сталью – меньшее выдерживаемое давление, а именно, 28 МПА (4000 фс/дюйм^2) против 42 МПа (свыше 6000 фс/дюйм^2).

Уравнение ван-Деемтера (*van Deemter equation*)

Уравнение, описывающие зависимость эффективности колонки (в терминах приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке) и основных факторов, влияющих на удерживание при элюировании. Его общий вид: $h = A + B/v + Cv$, где h – приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, A, B и C – константы, зависящие от объёмного расхода, коэффициентов диффузии, зернения и пр., v – приведенная скорость. Подробнее см. раздел 2.2.

Уравнение Нокса (*Knox equation*)

Уравнение, описывающее зависимость эффективности колонки (в терминах приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке) от основных факторов, определяющих процесс удерживания при элюировании. В общем виде выглядит следующим образом: $h = Av^{1/3} + \mathrm{B}/v + Cv$, где h – приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, A, B и C – постоянные, зависящие от расхода, коэффициентов диффузии, размеров зёрен и пр., v – приведенная скорость потока. Подробнее см. раздел 2.2.

Устойчивость (*Robustness*)

Термин, используемый в валидации методики и означающий то, насколько сказываются на достоверности получаемых результатов внесенные намеренно небольшие изменения параметров системы (например, значения pH, состав подвижной фазы, температура и т.п.).

Устройство ввода пробы: см. **Инжектор**.

Фактор ёмкости: см. **Коэффициент ёмкости**

Фенильная привитая фаза (*Phenyl bonded phase*)

Обращённо-фазный носитель со структурой поверхности Si–O–$SiCH_2C_6H_5$.

Ферула

Деталь соединения в хроматографе, деформация которой создаёт герметичное соединение, с одной стороны, вокруг трубки, а с другой - с коническим уплотнением на фитинге колонки.

Фильтр (*Filter*)

Пористый материал, с помощью которого из раствора удаляются твёрдые микрочастицы. Например, проходные фильтры удаляют микрочастицы из подвижной фазы, прежде чем она попадёт в инжектор.

Фильтрование элюента (*Filtering solvents*)

Процесс удаления твёрдых микрочастиц из элюента перед заливкой его в резервуар хроматографа. Зачастую изготовители растворителей не рекомендуют делать это, поскольку возможен обратный процесс – десорбция с фильтра в растворитель ранее задержанных фильтром микрочастиц. Однако фильтрование очень важно, если к растворителю добавляют модификаторы в твёрдом состоянии (фосфат калия, ацетат натрия и т.п.), поскольку они всегда содержат большое количество микрочастиц.

Флуориметрический детектор (*Fluorescence detector*)

Детектор, измеряющий интенсивность флуоресцентного излучения анализируемого вещества. Подлежат выбору длины волн как возбуждения, так и испускания. Предел обнаружения может быть очень низким, так как уровень шума во флуориметрическом детекторе крайне мал.

Флуорофор

Флуоресцирующая функциональная группа.

Фритта (*Frit*)

Пористый диск, используемый в ряде элементов системы ВЭЖХ. Фритты обычно выполнены из нержавеющей стали, титана (если требуется **совместимость с биологическими веществами**), ПЭЭК (если требуется уменьшенное содержание металла) или стекла. Фритты могут использоваться для удаления микрочастиц (как в

проходном фильтре) либо содержать материал набивки (как в фитингах колонок).

Фторопласт см.: **Политетрафторэтилен**.

Функция Гаусса (*Gaussian function*)

Функция, используемая для математического описания профиля концентрации в идеальном хроматографическом пике:

$$C = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\left(x^2 / 2\sigma^2\right)},$$

где *C* – концентрация в момент времени *x*, σ – стандартное отклонение в идеальном пике. Подробнее см. раздел 2.2.

Химически связанная фаза: см.: **Привитая фаза**

Хиральная неподвижная фаза (*Chiral stationary phase, CSP*)

Неподвижная фаза, полученная прививанием к поверхности высокочистого энантиомерного соединения, например, L- или D-аминокислоты. Поскольку хиральная неподвижная фаза имеет специфическую трёхмерную структуру, энантиомеры будут реагировать с поверхностью сильнее или слабее, в зависимости от того, соответствует ли их трёхмерная структура поверхностной, а значит, могут быть разделены.

Хиральная хроматография (*Chiral chromatgoraphy*)

Использование хиральности аналита для разделения его энантиомеров. Чаще всего достигается путём использования энантиомера высокой чистоты, привитого к поверхности (например, в **колонке Пиркле**). Такое разделение можно получить, добавляя хиральное соединение к подвижной фазе и используя обычные (например, обращённо-фазные) колонки.

Хиральность (*Chirality*)

Свойство молекулы быть несовместимой со своим изображеним в зеркале (*энантиомеры*). Условием хиральности молекулы является отсутствие зеркально-поворотных осей симметрии Sn. Наиболее часто встречаемый случай хиральных молекул – содержащих атом углерода в асимметричном окружении.

Хроматограмма (*Chromatogram*)

Запись сигнала детектора в процессе хроматографического разделения. Обычно на хроматограммах значения интенсивности сигнала увеличиваются вверх по оси *y*, значения времени – слева направо по оси *x*,

причём момент ввода пробы принимается за $t = 0$ (*Примечание*. На некоторых хроматограммах значения времени увеличиваются справа налево).

Хромофор (*Chromophore*)

Функциональная группа, поглощающая излучение в видимом или ультрафиолетовом диапазоне.

Цианопропильная привитая фаза (*Cyanopropyl bonded phase*)

Нормально-фазный носитель со структурой поверхности Si–O–$SiCH_2CH_2CH_2CN$.

Циклодекстрин (*Cyclodextrin*)

Любой из ряда циклических олигосахаридов, состоящих из блоков гликопиранозы (например, D-α-глюкозы), соединённых α-(1,4)-гликозидными связями. α-, β- и γ-циклодекстрины имеют, соответственно, шесть, семь и восемь блоков. В таких кольцевых системах полости имеют разный объём, что позволяет использовать их в колонках для эффективного разделения энантиомеров.

Число смешиваемости (*Miscibility number*)

Система числовых показателей для прогнозирования смешиваемости (или несмешиваемости) пары растворителей. Подробнее см. табл. 5 в Приложении.

Число теоретических тарелок, *N* (*Theoretical plates, number of*)

Мера общей эффективности колонки. Подробнее см. раздел 2.2.

Член *A* (*A term*)

Слагаемое в уравнении Нокса, описывающее изменчивость пиков за счёт вихревой дисперсии и эффектов массопереноса. Уравнение Нокса рассмотрено в разделе 2.2.

Член *B* (*B* term)

Слагаемое в уравнении Нокса, описывающее размытие пика за счёт продольной диффузии. Уравнение Нокса рассмотрено в разделе 2.2.

Член *C* (*C term*)

Слагаемое в уравнении Нокса, описывающее медленный массоперенос компонента между подвижной фазой в застойных зонах и неподвижной фазой. Подробно уравнение Нокса рассмотрено в разделе 2.2.

Чувствительность (*Sensitivity*)

Изменение величины отклика детектора при изменении концентрации аналита на единицу ($\Delta R/\Delta C$). Подробнее см. раздел 2.4.

Шкала активности Брокмана (*Brockmann activity scale*)

Шкала, разработанная в целях унификации степени хроматографической активности поверхности оксидов алюминия (Al_2O_3) и кремния (SiO_2). Зависит от адсорбции воды на поверхности; чем выше содержание воды, тем ниже активность.

Шум (*Noise*)

Любое возмущение в системе, вследствие которого будет получен сигнал детектора, не обусловленный конкретным определяемым веществом. Примеры: шум в электронной схеме, шум насоса, случайный шум.

Эксклюзионная хроматография (*Size-exclusion chromatograph, SEC*)

Совокупность способов разделения молекул по размеру, а не по различию адсорбционных свойств. Разновидностями эксклюзионной хроматографии являются **гель-проникающая** и **гель-фильтрационная**.

Эксклюзионный объём, V_e (*Exclusion volume*)

В колонке, набивка которой имеет строго определённый диаметр пор, компоненты с размером частиц больше этого диаметра не проникают в поры и элюируются все одновременно; это удерживаемый объём этих веществ, называемый эксклюзионным. Наибольший размер частицы в эксклюзионной хроматографии. Подробнее см. подраздел 2.5 Ж.

Электрохимический детектор (*Electrochemical detector*)

Детектор, измеряющий силу электрического тока. К этому классу относятся **амперметрический**, **кулонметрический** и потенциометрический детекторы.

Элюат (*Eluate*)

Вещество на выходе колонки (подвижная фаза, определяемые вещества и пр.).

Элюент (*Eluent*)

Растворитель, однокомпонентный или смесь, содержащая иногда также твердые вещества (модификаторы) формирующий подвижную фазу.

Элюирование (*Elution*)

Процесс перемещения компонентов пробы, растворённых в элюенте, из инжектора через колонку в детектор.

Элюирующая сила, ε^0 (*Eluotropic strength*)

Эмпирическая величина, примерно выражающая способность элюента элюировать определяемые вещества. Чем больше значение ε^0, тем сильнее растворитель.

Элюит (*Eluite*)

Крайне редко применяемый термин, относящийся только к определяемым веществам на выходе колонки.

Элюотропный ряд (*Eluotropic series*)

Ранжирование подвижных фаз по способности элюировать определяемые вещества, примерно в порядке полярности. Параметр под названием «элюирующая сила», ε^0, представляет собой попытку количественного выражения различий. Более подробно см. раздел 2.3 и табл. 5 в Приложении.

Энантиомеры (*Enantiomeric compounds*)

Вещества, содержащие в составе молекулы хиральный центр (четыре разные функциональные группы, присоединённые к одному центральному атому водорода), вследствие чего молекулы существуют в виде зеркальных отображений, которые невозможно совместить наложением. Также называются правыми и левыми оптическими изомерами.

Энд-кэппинг: см. **Блокирование остаточных силанольных групп поверхности**

Эффективность (*Efficiency*)

Мера качества колонки, зачастую выражаемая количественно либо числом теоретических тарелок, N, либо приведенной высотой, эквивалентной теоретической тарелке, h. Чем больше значение N или чем меньше значение h, тем выше эффективность колонки.

Англо-русский указатель

***A* term**

Член *A*

Accuracy

Точность

Acid-base dissociation constants

Константы кислотно-основной диссоциации K_a или K_b (в логарифмической форме pK_a и pK_b)

Adjusted retention time

Приведенное время удерживания, t_r'

Adsorbent

Адсорбент

Adsorption chromatography

Адсорбционная хроматография: см. Жидкостно-адсорбционная хроматография

Adsorption isotherm

Изотерма адсорбции

Affinity chromatography

Аффинная хроматография

Alkoxysilane

Алкоксисилан

Alumina

Оксид алюминия

Aminopropyl bonded phase

Аминопропиловая привитая фаза

Amperometric detector

Амперметрический детектор

Ampholyte

Амфолит

Analyte

Анализируемое вещество

Аналит

Analytical HPLC column

Аналитическая колонка для ВЭЖХ

Anion
Анион
Anion exchange
Анионный обмен
Анионообмен
APCI: см. **Atmospheric-pressure chemical ionization interface**
Artifact
Артефакт
Asymmetry factor
Коэффициент асимметрии
Atmospheric-pressure chemical ionization interface (APCI)
Интерфейс для химической ионизации при атмосферном давлении
Autoinjector
Автоинжектор
Автоматическое устройство ввода пробы
Autosampler
Автоматическое устройство подготовки и ввода пробы
Автосамплер
Axial diffusion or dispersion
Размытие в осевом направлении
***B* term**
Член *B*
Backflush
Встречное промывание
Обращение потока
Backpressure
Перепад давления
Band broadening
Размытие зоны
Baseline
Нулевая линия
Beer's law
Закон Бэра

BET surface area determination
Определение удельной площади поверхности по методу БЭТ
Biocompatible
Совместимый с биологическими веществами
Bonded phase
Привитая фаза
Химически связанная фаза
Bonded phase chromatography
Привитофазная хроматография
Brockmann activity scale
Шкала активности Брокмана
Buffer
Буфер
Butyl bonded phase
Бутильная привитая фаза
***C* term**
Член *C*
Calibration curve
Градуировочная кривая
Калибровочная кривая
Capacity
Ёмкость
Capacity factor
Коэффициент ёмкости, k'
Фактор ёмкости
Carbon load
Содержание углерода, %C
Cartridge column
Картриджная колонка
Патронная колонка
Cation
Катион

Cation exchange
Катионный обмен
Катионообмен
Cavitation
Кавитация
Chain length
Длина цепи
Check valve
Обратный клапан
Chiral chromatgoraphy
Хиральная хроматография
Chiral stationary phase (CSP)
Хиральная неподвижная фаза
Chirality
Хиральность
Chromatogram
Хроматограмма
Chromophore
Хромофор
Column
Колонка
Column switching
Переключение колонок
Column tubing
Трубка колонки
Compressibility
Сжимаемость
Conductivity detector
Кондуктометрический детектор
Connection tubing
Соединительные трубки
Coulometric detector
Кулонметрический детектор

Coverage
Степень покрытия
CSP: см. **Chiral stationary phase**
Cyanopropyl bonded phase
Цианопропильная привитая фаза
Cyclodextrin
Циклодекстрин
DAD: см. **Diode-array detector**
Deactivated base silica
Деактивированный оксид кремния
Deactivation
Деактивация
Degassing
Дегазация
Derivatization
Дериватизация
Получение производных
Desorption
Десорбция
Detection limit, d.l.
Предел обнаружения
Detector
Детектор
Diaphragm pump
Диафрагменный насос
Diffusion
Диффузия
Diffusion coefficient
Коэффициент диффузии, *D*
Diol bonded phase
Диольная привитая фаза
Drift
Дрейф

Eddy diffusion
Вихревая диффузия
Efficiency
Эффективность
Electrochemical detector
Электрохимический детектор
ELSD: см. **Evaporative light-scattering detector**
Eluate
Элюат
Eluite
Элюит
Eluotropic series
Элюотропный ряд
Eluotropic strength
Элюирующая сила, ε^0
Elution
Элюирование
Elution volume
Объём элюирования, V_r
Enantiomeric compounds
Энантиомеры
Endcapping
Блокирование остаточных силанольных групп поверхности
Энд-кэппинг
Endfitting
Концевые фитинги
Evaporative light-scattering detector, ELSD
Испарительный нефелометрический детектор
Exclusion limit
Предел эксклюзии
Exclusion volume
Эксклюзионный объём, V_e
Extracolumn volume
Внеколоночный объём

Ferrule
Манжета
Обжимная втулка
Ферула
Filter
Фильтр
Filtering solvents
Фильтрование растворителя
Fines
Мелочь
Fixed-wavelength UV-visible detector
Детектор УФВ с фиксированной длиной волны
Flash point
Температура вспышки
Flow rate
Расход объёмный
Flow-injection analysis
Анализ с вводом пробы в поток
Fluorescence detector
Флуориметрический детектор
Fluorophore
Флуорофор
Fraction collector
Коллектор фракций
Frit
Фритта
Fronting
Удлинение фронта пика
Gaussian curve
Распределение Гаусса
Gaussian function
Функция Гаусса
Gel filtration chromatography, GFC
Гель-фильтрационная хроматография

Gel permeation chromatography, GPC
Гель-проникающая хроматография
GFC: см. **Gel filtration chromatography**
Ghost peak
Пик-призрак
GPC: см. **Gel permeation chromatography**
Gradient elution
Градиентное элюирование
Gradient mixer
Градиентный смеситель
Guard column
Защитная колонка
Height equivalent to a theoretical plate, HETP
Высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ, H
HETP: см. **Height equivalent to a theoretical plate**
High-performance liquid chromatography, HPLC
Высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ
HPLC: см. **High-performance liquid chromatography**
Hydration
Гидратация
Hydrofobic interaction
Гидрофобное взаимодействие
Hydrogen bonding
Водородная связь
Immiscible
Несмешиваемость
Inclusion volume
Инклюзионный объём, V_i
Injection
Ввод пробы
Injector
Дозатор
Инжектор
Устройство ввода пробы

Injector loop
Петля-дозатор
In-line filter
Проходной фильтр
Internal reversed-phase chromatography
Внутренняя обращённо-фазная хроматография
Internal standard
Внутренний стандарт
Interparticle volume
Межзёренный объём
Ion suppression
Подавление ионов
Ion-exchange capacity
Ионообменная ёмкость
Ion-exchange chromatography
Ионообменная хроматография
Ionic strength
Ионная сила, μ
Ionization constant
Константа ионизации: см. Константы кислотно-основной диссоциации.
Ion-pair chromatography, IPC
Ион-парная хроматография
IPC: см. **Ion-pair chromatography**
Irregular packing material
Материал набивки, имеющий несферическую форму частиц
Isocratic elution
Изократическое элюирование
Isoelectric point
Изоэлектрическая точка, pI
Isomers
Изомеры
Isotherm
Изотерма: см. Изотерма адсорбции.

Knox equation
Уравнение Нокса
LALLS: см. **Low-angle laser light-scattering detector**
Langmuir isotherm
Изотерма Ленгмюра
LC: см. **Liquid chromatography**
Ligand-exchange chromatography
Лигандообменная хроматография
Limit of quantitation, LOQ
Предел количественного определения
Linear range: см. также: **Range**
Линейный диапазон
Linear velocity
Линейная скорость, *u*
Linerarity
Линейность
Liquid-liquid chromatography, LLC
Жидкостно-жидкостная хроматография
Liquid-solid chromatography, LSC
Жидкостно-адсорбционная хроматография
LLC: см. **Liquid-liquid chromatography**
LOD: см. **Limit of detection**
LOQ: см. **Limit of quantitation**
Longitudinal diffusion
Продольная диффузия
Low-angle laser light-scattering detector, LALLS
Проточный лазерный нефелометрический детектор.
LSC: см. **Liquid-solid chromatography**
Mass transfer
Массоперенос
Mesh size
Номер сита
Metallophilic interactions
Металлофильное взаимодействие

Micellar chromatography
Мицеллярная хроматография
Micelle
Мицелла
Microbore HPLC column
Микроколонка для ВЭЖХ
Miscibility
Смешиваемость
Miscibility chart
Диаграмма смешиваемости
Miscibility number
Число смешиваемости
Miscible
Смешиваемые
Mismatch
Несоответствие
Mixed-mode packing materials and columns
Смешанные материалы набивки и колонки
Molecular-imprinted bonded phases
Привитые фазы с отпечатками молекул
Moments
Параметры пика
Monomeric bonded phase
Мономерная привитая фаза
Narrow-bore HPLC column
Тонкая колонка для ВЭЖХ
Noise
Шум
Nomogram
Номограмма
Nonporous
Непористый
Normal-phase chromatography
Нормально-фазная хроматография

Nut
Гайка
Octadecyl bonded phase
Октадецильная привитая фаза
Octyl bonded phase
Октильная привитая фаза
On-column injection
Ввод пробы непосредственно в колонку
Optimization
Оптимизация
Overload
Перегрузка
Packing material
Набивка
Paired-ion chromatography: см. **Ion-pair chromatography**
Particle size
Диаметр зерна, d_p
Зернение см
Particle size distribution
Распределение размеров зёрен
Partition coefficient
Коэффициент распределения, K
PDA: см. **Photodiode array detector**
Peak
Пик
Peak capacity
Максимальное количество пиков, η
PEEK
ПЭЭК, полиэфирэфиркетон
Pellicular
Поверхностно-пористый
Permeability
Проницаемость, K

Phenyl bonded phase
Фенильная привитая фаза
Photodiode array detector, PDA
Диодно-матричный детектор, ДМД
PIC reagents
Ион-парные реагенты
Pirkle column
Колонка Пиркле
Piston
Плунжер
Поршень
Piston seal
Поршневое уплотнение
Уплотнение плунжера
Polymeric bonded phase
Полимерная привитая фаза
Polytetrafluoroethylene, PTFE, Teflon®
Политетрафторэтилен
ПТФЭ
Тефлон®)
Фторопласт
Pore diameter
Диаметр поры
Pore volume
Объём пор
Porosity
Пористость, ε
Post-column derivatization
Послеколоночная дериватизация
Постколоночная дериватизация
Precision
Сходимость
Precolumn
Предколонка

Preparative chromatography
Препаративная хроматография
Pressure transducers and pressure gauges
Датчики и преобразователи давления
PTFE: см. **Polytetrafluoroethylene**
Qualitative analysis
Качественный анализ
Quantitation limit
Предел количественного определения
Quantitative analysis
Количественный анализ
Range
Диапазон
Reduced plate height
Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, h
Reduced velocity
Приведенная скорость, v
Reequilibration time
Время уравновешивания
Refractive index
Показатель преломления, n
Refractive index detector
Рефрактометрический детектор
Reservoir
Резервуар
Resolution
Разрешение, R
Response factor
Коэффициент отклика
Response time
Время отклика: см. Постоянная времени.
Retention
Удерживание

Retention mechanism
Механизм удерживания
Retention time
Время удерживания, t_r
Retention volume
Удерживаемый объём, V_r
Reversed-phase chromatography, RPC
Обращённо-фазная хроматография
Robustness
Робастность
Устойчивость методики
Ruggedness
Выносливость методики
Живучесть методики
Sample
Проба
Sample preparation
Пробоподготовка
Saturated solution
Насыщенный раствор
SAX: см. **Strong anion-exchange material**
SCX: см. **Strong cation-exchange material**
SEC: см. **Size-exclusion chromatography**
Selectivity
Селективность
Selectivity triangle
Треугольник селективности
Semipreparative chromatography
Полупрепаративная хроматография
Sensitivity
Чувствительность
Separation
Разделение

Separation factor
Коэффициент разделения, α
Signal-to-noise ratio
Отношение сигнал-шум, *S*/*N*
Silanol group
Силанольная группа
Silanophilic interactions
Силанофильные взаимодействия
Silica
Оксид кремния
Siloxane
Силоксан
Silylation
Силилирование
Size-exclusion chromatography, SEC
Эксклюзионная хроматография
Slurry
Суспензия
Solid-phase extraction, SPE
Твердофазная экстракция, ТФЭ
Solid-phase microextraction, SPME
Твердофазная микроэкстракция, ТФМЭ
Solubility
Растворимость
Solute
Определяемое вещество
Solvent
Растворитель
Solvent optimization triangle
Треугольник оптимизации элюента
Solvent polarity parameter
Параметр полярности растворителя, *P*'
Solvent strength
Сила растворителя

Solvent strength parameter
Параметр силы растворителя
Solvophobic interactions
Сольвофобные взаимодействия
SPE: см. **Solid-phase extraction**
Specificity
Специфичность
SPME: см. **Solid-phase microextraction**
Stagnant mobile phase
Застойные области подвижной фазы
Stationary phase
Неподвижная фаза
Strong anion-exchange material, SAX
Сильный анионит
Strong cation-exchange material, SCX
Сильный катионит
Suppressor column
Колонка-подавитель
Surface area
Удельная поверхность
Swelling
Набухание
System peak
Системный пик
Tailing
Образование «хвостов»
Удлинение ниспадающей части пика
Teflon®: см. **Polytetrafluoroethylene**
Theoretical plates, number of
Число теоретических тарелок, *N*
Time constant
Постоянная времени, τ
Titanium
Титан

Total permeation volume
Общий объём проникновения, V_p
Tubing
Трубопроводы
Ultraviolet - visible detector
Детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов
Детектор УФВ
Universal fitting
Универсальный фитинг
UV cutoff
Граница пропускания в УФ диапазоне
UV-vis detector: см. **Ultraviolet - visible detector**
Vacancy peak chromatgoraphy
Ваканто-хроматография
Validation
Валидация
van Deemter equation
Уравнение ван-Деемтера
Variable-wavelength UV-vis detector
Детектор УФВ с переменной длиной волны
Viscosity
Вязкость, η
Void
Полость
Void time
Время выхода неудерживаемого компонента, t_0
Void volume
Объём неудерживаемого компонента, V_o
Wall effects
Стеночные эффекты
WAX: см. **Weak anion-exchange material**
WCX: см. **Weak cation-exchange material**
Weak anion-exchange material, WAX
Слабый анионит

Weak cation-exchange material, WCX

Слабый катионит

Wetting

Замачивание

Window diagram

Оконная диаграмма

Zirconia

Окись циркония

Zwitterions

Амфоионы

Амфотерные ионы

Приложение
ТАБЛИЦЫ ОСНОВНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Таблица 1. Границы пропускания в УФ диапазоне часто применяемых растворителей [а]

Растворитель	нм
Вода	< 190
Ацетонитрил [б]	190
Пентан	190
Гексан [б]	195
Гептан	200
Декагидронафталин (декалин®)	200
Циклогексан	200
Циклопентан	200
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	205
Метанол (метиловый спирт)	205
Этанол (этиловый спирт) [в]	205
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	210
2-метоксиэтанол	210
Метил-*трет*-бутиловый эфир	210
Трифторуксусная кислота (0,1 %-ный водный раствор)	210
Тетрагидрофуран [б]	212
1,4-диоксан	215
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	215
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	215
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	215
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир)	220
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	220
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	220
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	228
Дихлорметан (хлористый метилен)	233
Хлороформ	245

[а] A = 1,0 по сравнению с воздухом в 1-см кювете.

[б] Некоторые растворители выпускаются также в классе чистоты не для спектрофотометрии. В таблице приведены характеристики растворителей класса чистоты для УФ спектрофотометрии.

[в] Обычно используется в спиртовом реагенте, представляющем собой смесь этанола, изопропилового спирта и метанола.

Растворитель	нм
н-бутилацетат	254
Этилацетат	256
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	260
Четырёххлористый углерод	263
N,*N*-диметилацетамид	268
N,*N*-диметилформамид	268
Диметилсульфоксид (ДМСО)	268
Бензол	278
Толуол	284
Хлорбензол	287
1,2-дихлорбензол	295
1,2,4-трихлорбензол	308
Метилэтилкетон (2-бутанон)	329
Метилбутилкетон (2-гексанон)	330
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	330
Пиридин	330
Ацетон	331
Метилпропилкетон (2-пентанон)	331
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	334

Таблица 2. Показатели преломления растворителей [a]

Растворитель	Показатель преломления
Метанол	1,3284
Вода	1,3330
Ацетонитрил	1,3441
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	1,3524
Пентан	1,3575
Ацетон	1,3587
Этанол (этиловый спирт)	1,3600
Проприонитрил (25 ºC)	1,3655
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	1,3682
Метил-*трет*-бутиловый эфир	1,3689
Уксусная кислота	1,3716
Этилацетат	1,3724
Гексан	1,3749
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	1,3772
Метилэтилкетон (2-бутанон)	1,3788
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир)	1,3796
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	1,3856
Диэтиламин	1,3861
2-метил-2-пропанол (*трет*-бутиловый спирт)	1,3870
Гептан	1,3876
Метилпропилкетон (2-пентанон)	1,3901
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	1,3914
н-бутилацетат	1,3942
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	1,3957
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	1,3959
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	1,3970
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	1,3993
Триэтиламин	1,4000
Метилбутилкетон (2-гексанон)	1,4007
2-метоксиэтанол	1,4021
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	1,4021
Циклопентан	1,4064
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	1,4072
Тетрагидрофуран	1,4072
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	1,4087
Метиламилкетон (2-гептанон)	1,4087
1,4-диоксан	1,4224
Дихлорметан (хлористый метилен)	1,4224

[a] Если не указано иное, при 20 ºC.

Растворитель	Показатель преломления
Циклогексан	1,4264
N,*N*-диметилформамид	1,4305
Этиленгликоль	1,4310
N,*N*-диметилацетамид	1,4384
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	1,4448
Хлороформ	1,4458
Четырёххлористый углерод	1,4601
Декагидронафталин (декалин®)	1,4758
Диметилсульфоксид (ДМСО)	1,4783
Толуол	1,4969
Бензол	1,5010
Пиридин	1,5102
Хлорбензол	1,5248
1,2-дихлорбензол (25 ºC)	1,5514
1,2,4-трихлорбензол	1,5717

Таблица 3. Растворимость воды в растворителях [а)]

Растворитель	Растворимость, %
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	0,006
Декагидронафталин (декалин®)	0,006
Четырёххлористый углерод	0,008
Пентан	0,009
Гексан	0,01
Гептан (25 ºС)	0,01
Циклогексан	0,01
Циклопентан	0,01
1,2,4-трихлорбензол	0,02
Толуол (25 ºС)	0,03
Хлорбензол	0,04
Хлороформ	0,06
Бензол	0,07
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	0,08
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	0,15
Дихлорметан (хлористый метилен)	0,24
1,2-дихлорбензол (25 ºС)	0,31
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	0,55
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	1,26
Метиламилкетон (2-гептанон)	1,3
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	1,3
Метил-*трет*-бутиловый эфир	1,5
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	1,9
н-бутилацетат	1,9
Метилбутилкетон (2-гексанон)	2,1
Метилпропилкетон (2-пентанон)	3,3
Этилацетат	3,3
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	9,2
Метилэтилкетон (2-бутанон)	10
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	16,4
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	20
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	37
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир)	100 [б)]
1,4-диоксан	100
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	100
2-метоксиэтанол	100
N,*N*-диметилацетамид	100

[а)] Если не указано иное, при 20 ºС.

[б)] 100 = смешиваемость.

Растворитель	Растворимость, %
N,N-диметилформамид	100
Ацетон	100
Ацетонитрил	100
Диметилсульфоксид (ДМСО)	100
Диэтиламин	100
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	100
Метанол (метиловый спирт)	100
Пиридин	100
Тетрагидрофуран	100
Триэтиламин	100
Уксусная кислота	100
Фосфорная кислота (85 %)	100
Этанол (этиловый спирт)	100
Этиленгликоль	100

Таблица 4. Растворимость растворителей в воде [а)]

Растворитель	Растворимость, %
2,2,4-триметилпентан (изооктан) (25 ºС)	0,0002
Гептан (25 ºС)	0,0003
Гексан (25 ºС)	0,0014
1,2,4-трихлорбензол	0,0025
Пентан	0,004
Циклогексан	0,006
Циклопентан	0,01
1,2-дихлорбензол (25 ºС)	0,013
Декагидронафталин (декалин®) (25 ºС)	< 0,02
Хлорбензол	0,05
Бензол	0,07
Толуол	0,074
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	0,08
Четырёххлористый углерод	0,08
н-бутилацетат	0,43
Метиламилкетон (2-гептанон)	0,44
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	0,54
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	0,81
Хлороформ	0,81
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	0,94
Дихлорметан (хлористый метилен)	1,6
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	1,7
Метилбутилкетон (2-гексанон)	1,75
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	1,9
Метил-*трет*-бутиловый эфир	4,8
Метилпропилкетон (2-пентанон)	5,9
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	6,9
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	7,9
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	8,5
Этилацетат	8,7
Проприонитрил	10,3
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	20
Метилэтилкетон (2-бутанон)	24
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир)	100 [б)]
1,4-диоксан	100
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	100
2-метоксиэтанол	100

[а)] Если не указано иное, при 20 ºС.

[б)] 100 = смешиваемость.

Растворитель	Растворимость, %
N,*N*-диметилацетамид	100
N,*N*-диметилформамид	100
Ацетон	100
Ацетонитрил	100
Диметилсульфоксид (ДМСО)	100
Диэтиламин	100
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	100
Метанол (метиловый спирт)	100
Пиридин	100
Тетрагидрофуран	100
Триэтиламин	100
Уксусная кислота	100
Фосфорная кислота (85 %)	100
Этанол (этиловый спирт)	100
Этиленгликоль	100

Таблица 5. Сила растворителей на различных сорбентах

Растворитель	$\varepsilon^0(Al_2O_3)$ [а]	$\varepsilon^0(SiO_2)$ [а]	$\varepsilon^0(C_{18})$ [а]	M [б]	P'
Пентан	≡ 0,00	≡ 0,00	–	–	0,0
Гексан	0,00 – 0,01	0,00 – 0,01	–	29	0,1
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	0,01	0,01	–	29	0,1
Циклогексан	0,04	0,03	–	28	0,2
Четырёххлористый углерод	0,17 – 0,18	0,11	–	–	1,6
1-хлорбутан	0,26 – 0,30	0,20	–	–	1,0
Толуол	0,20 – 0,30	0,22	–	–	2,4
Хлорбензол	0,30 – 0,31	0,23	–	–	2,7
Бензол	0,32	0,25	–	21	–
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	0,38	0,38 – 0,43	–	–	2,8
Дихлорметан (хлористый метилен)	0,36 – 0,42	0,30 – 0,32	–	20	3,1
Хлороформ	0,36 – 0,40	0,26	–	19	4,1
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	0,44 – 0,49	–	–	–	3,5
Метилэтилкетон (2-бутанон)	0,51	–	–	17	5,7
Ацетон	0,56 – 0,58	0,47 – 0,53	8,8	16	5,1
1,4-диоксан	0,56 – 0,61	0,49 – 0,51	11,7	17	4,8
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	0,61	–	–	–	–
Тетрагидрофуран	0,45 – 0,62	0,53	3,7	17	4,0
Метил-*трет*-бутиловый эфир	0,3 – 0,62	0,48	–	–	2,5
Этилацетат	0,58 – 0,62	0,38 – 0,48	–	19	4,4
Диметилсульфоксид	0,62 – 0,75	–	–	9	7,2
Диэтиламин	0,63	–	–	–	–
Ацетонитрил	0,52 – 0,65	0,50 – 0,52	3,1	11	5,8
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	0,70	–	–	15	3,9
Пиридин	0,71	–	–	16	5,3
2-метоксиэтанол	0,74	–	–	13	5,5

[а] Данные приведены в пределах по разным источникам. Символ ≡ означает «по определению».

[б] Если для двух растворителей $|M_1 - M_2| < 15$, они смешиваемы; если $|M_1 - M_2| = 16$, смешиваемость зависит от температуры (между 25 и 75 ºС), если $|M_1 - M_2| > 17$, растворители несмешиваемы.

Растворитель	$\varepsilon^0(Al_2O_3)$ [а]	$\varepsilon^0(SiO_2)$ [а]	$\varepsilon^0(C_{18})$ [а]	*M* [б]	*P′*
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	0,78 – 0,82	–	10,1	15	4,0
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	0,78 – 0,82	0,60	8,3	15	3,9
Этанол (этиловый спирт)	0,88	–	3,1	14	–
Метанол	0,95	0,70 – 0,73	≡ 1,0	–	5,1
Этиленгликоль	1,11	–	–	–	–
Диметилформамид	–	–	7,6	12	6,4
Вода	–	–	–	–	10,2

Таблица 6. Вязкость растворителей [a]

Растворитель	Вязкость, мПа·с (сП)
Пентан	0,23
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	0,24
Метил-*трет*-бутиловый эфир	0,27
Проприонитрил (25 ºC)	0,29
Гексан	0,31
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	0,33
Ацетон	0,36
Ацетонитрил	0,38
Диэтиламин	0,39
Триэтиламин	0,39
Гептан	0,41
Метилэтилкетон (2-бутанон)	0,43
Дихлорметан (хлористый метилен)	0,44
Циклопентан	0,44
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	0,45
Этилацетат	0,45
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир, 25 ºC)	0,46
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	0,50
Метилпропилкетон (2-пентанон)	0,51
Метанол (метиловый спирт)	0,55
Тетрагидрофуран	0,55
Хлороформ	0,57
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	0,59
Толуол	0,59
Метилбутилкетон (2-гексанон)	0,63
Бензол	0,65
н-бутилацетат	0,73
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	0,79
Метиламилкетон (2-гептанон)	0,8
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	0,8
Хлорбензол	0,80
N,*N*-диметилацетамид (25 ºC)	0,84
N,*N*-диметилформамид	0,92
Трифторуксусная кислота	0,926
Пиридин	0,95
Четырёххлористый углерод	0,97
Вода	1,00
Циклогексан	1,0

[a] Если не указано иное, при 20 ºC.

Растворитель	Вязкость, мПа·с (сП)
Этанол (этиловый спирт)	1,19
Уксусная кислота (15 ºС)	1,31
1,2-дихлорбензол (25 ºС)	1,32
1,4-диоксан	1,37
2-метоксиэтанол	1,72
Фосфорная кислота (85 %)	1,88
Диметилсульфоксид (ДМСО)	2,24
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	2,3
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	2,4
Декагидронафталин (декалин®) (25 ºС)	2,42
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	2,98
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	3,68
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	4,21
2-метил-2-пропанол (*трет*-бутиловый спирт, 25 ºС)	4,31
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	6,68
Этиленгликоль	21

Таблица 7. Плотность растворителей [a]

Растворитель	Плотность, г/мл
Пентан	0,626
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	0,634
Гексан	0,659
Гептан	0,684
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	0,692
Диэтиламин	0,707
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	0,713
Триэтиламин	0,726
Метил-*трет*-бутиловый эфир	0,741
Циклопентан	0,745
Проприонитрил	0,777
Циклогексан	0,778
Ацетонитрил	0,782
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	0,785
2-метил-2-пропанол (*трет*-бутиловый спирт)	0,786
Этанол (этиловый спирт)	0,789
Ацетон	0,790
Метанол (метиловый спирт)	0,791
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	0,801
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	0,803
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	0,804
Метилэтилкетон (2-бутанон)	0,805
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	0,808
Метилпропилкетон (2-пентанон)	0,808
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	0,810
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	0,811
Метилбутилкетон (2-гексанон)	0,811
Метиламилкетон (2-гептанон)	0,815
1,2-диметоксиэтан (этиленгликольдиметиловый эфир)	0,866
Толуол	0,867
Бензол	0,874
н-бутилацетат	0,880
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	0,886
Декагидронафталин (декалин®)	0,887
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	0,888
Тетрагидрофуран	0,888
Этилацетат	0,901
N,*N*-диметилацетамид (25 ºC)	0,937

[a] Если не указано иное, при 20 ºC.

Растворитель	Плотность, г/мл
N,*N*-диметилформамид	0,949
2-метоксиэтанол	0,965
Пиридин	0,983
Вода	0,998
1,4-диоксан	1,034
Уксусная кислота	1,049
Диметилсульфоксид (ДМСО)	1,100
Хлорбензол	1,106
Этиленгликоль	1,109
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	1,253
1,2-дихлорбензол	1,306
Дихлорметан (хлористый метилен)	1,326
1,2,4-трихлорбензол	1,454
Трифторуксусная кислота	1,489
Хлороформ	1,489
Четырёххлористый углерод	1,594
Фосфорная кислота (85 %)	1,88

Таблица 8. Температура вспышки растворителей [a)]

Растворитель	Температура вспышки, °С
Этиловый эфир (диэтиловый эфир)	– 45
Пентан	– 40
Циклопентан	– 37
Диэтиламин	– 28
Изопропиловый эфир (диизопропиловый эфир)	– 28
Метил-*трет*-бутиловый эфир	– 27
Гексан	– 22
Ацетон	– 20
Циклогексан	– 20
Тетрагидрофуран	– 14
Бензол	– 11
н-бутилхлорид (1-хлорбутан)	– 10
Метилэтилкетон (2-бутанон)	– 9
Гептан	– 4
Этилацетат	– 4
2,2,4-триметилпентан (изооктан)	4
Толуол	4
Ацетонитрил	6
Триэтиламин	6
Метилпропилкетон (2-пентанон)	9
2-метил-2-пропанол (*трет*-бутиловый спирт)	11
Метанол (метиловый спирт)	11
1,4-диоксан	12
Изопропиловый спирт (2-пропанол)	12
1,2-дихлорэтан (двухлористый этилен)	13
Этанол (этиловый спирт)	13
Метилизобутилкетон (2-метил-4-пентанон)	18
Пиридин	20
1-пропанол (*н*-пропиловый спирт)	23
2-бутанол (*бис*-бутиловый спирт)	24
Метилбутилкетон (2-гексанон)	25
2-метил-1-пропанол (изобутиловый спирт)	28
Хлорбензол	29
1-пентанол (*н*-пентиловый спирт)	33
Метилизоамилкетон (2-метил-5-гексанон)	36
Проприонитрил	36
1-бутанол (*н*-бутиловый спирт)	37
2-метоксиэтанол	39

[a)] В приборе Тага, при закрытой чашке.

Растворитель	Температура вспышки, ºC
Метиламилкетон (2-гептанон)	39
Уксусная кислота	40
N,*N*-диметилформамид	58
Декагидронафталин (декалин®)	58
N,*N*-диметилацетамид	63
1,2-дихлорбензол	69
Диметилсульфоксид (ДМСО)	95
1,2,4-трихлорбензол	105
Вода	Нет
Дихлорметан (хлористый метилен)	Нет
Хлороформ	Нет
Четырёххлористый углерод	Нет

Таблица 9. Таблица смешиваемости растворителей

□ Смешиваемые
■ Несмешиваемые

	Ацетон	Ацетонитрил	Бензол	Бутанол	Вода	Гексан	Гептан	Диметилсульфокси	Диметилформамид	Диоксан	Дихлорметан	1,2-дихлорэтан	Изооктан	Изопропиловый спирт	Ксилол	Метанол	Метил-*трет*-бутиловый эфир	Метилэтилектон	Пентан	Тетрагидрофуран	Толуол	Хлороформ	Циклогексан	Четырёххлористый углерод	Этилацетат	Этиаловый эфир	Этанол
Ацетон	—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Ацетонитрил		—	□	□	□	■	■	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	■	□	□	□	□
Бензол			—	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Бутанол				—	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Вода					—	■	■	□	□	□	■	■	■	□	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	□
Гексан						—	□	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Гептан							—	■	■	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Диметилсульфокси								—	□	□	□	□	■	□	■	□	□	□	■	□	□	□	■	□	□	■	□
Диметилформамид									—	□	□	□	■	□	■	□	□	□	■	□	□	□	■	□	□	□	□
Диоксан										—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Дихлорметан											—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
1,2-дихлорэтан												—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Изооктан													—	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Изопропиловый спирт														—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Ксилол															—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Метанол																—	□	□	■	□	□	□	■	□	□	□	□
Метил-*трет*-бутиловый эфир																	—	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Метилэтилектон																		—	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Пентан																			—	□	□	□	□	□	□	□	□
Тетрагидрофуран																				—	□	□	□	□	□	□	□
Толуол																					—	□	□	□	□	□	□
Хлороформ																						—	□	□	□	□	□
Циклогексан																							—	□	□	□	□
Четырёххлористый углерод																								—	□	□	□
Этилацетат																									—	□	□
Этиаловый эфир																										—	□
Этанол																											□

Таблица 10. Гранулометрическая шкала [a]

Число меш	Размер отверстия, мм
3	6,73
3,5	5,66
4	4,76
5	4,00
6	3,36
7	2,83
8	2,38
10	2,00
12	1,68
14	1,41
16	1,19
18	1,00
20	0,84
25	0,71
30	0,59
35	0,50
40	0,42
45	0,35
50	0,297
60	0,250
70	0,210
80	0,177
100	0,149
120	0,125
140	0,105
170	0,088
200	0,074
230	0,062
270	0,053
325	0,044
400	0,037
500	0,031

[a] Источники:

1. Leeds & Northrup Application Sheet
2. B.L. Karger, L.R. Snyder, and Cs. Horváth, *An Introduction to Separation Science*, John Wiley and Sons, New York, 1973, p. 544.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Краткая справка

Приведенная далее таблица поможет быстро выявить источник нарушения нормальной работы хроматографа. Подробнее порядок работы в нештатных ситуациях (например, очистки обратного клапана или испытания в градиентном режиме) описан по тексту. См. соответствующие разделы и предметный указатель для поиска нужного материала.

Нарушение	Причина и порядок устранения
Система не работает	1. Убедитесь, что все блоки подключены к электропитанию. 2. Проверьте все соединения (электрических и информационных кабелей). 3. Убедитесь, что выключатели питания на всех блоках включены. 4. Проверьте и, при необходимости, замените плавкие предохранители.
Насос включён, подачи элюента нет	1. Проверьте установку расхода элюента. 2. Проверьте установки по минимальному и максимальному допустимому перепаду давления. 3. Запустите программу по ненулевой скорости потока элюента.
Подвижная фаза не проходит через колонку, нет перепада давления, насос не совершает обратный ход	1. Забился входной фильтр (убедитесь, что элюенты, содержащие твёрдую фазу, модификаторы, например, ацетат натрия или фосфат калия, профильтрованы перед употреблением). Выполните очистку или замену фильтра. 2. Попадание воздуха в трубопровод или обратный клапан низкого давления. Удалите промыванием воздух из трубопровода и клапана (не пропуская при этом жидкость через колонку). 3. Не работают или загрязнены обратные клапаны. Выполните очистку или замену. 4. Сильная течь в уплотнении плунжера насоса. Замените его. 5. Оставлен открытым байпас колонки (или промывной клапан). Перекройте подачу подвижной фазы и закройте байпас. 6. Механически повреждён плунжер насоса. Заме-

	ните плунжер и уплотнение.
Малое значение перепада давления, менее 85 % нормального	1. В изократическом режиме: проверьте элюент (возможно, элюент имеет низкую вязкость). 2. В градиентном режиме: проверьте работу клапанов, с помощью которых задаётся состав подвижной фазы. (Примечание. Проверьте по отдельности величины объёмных расходов растворителей А, Б и В. Если они правильны, проверьте работу на составляемой насосом смеси 50:50 и т.д.) 3. Проверьте температуру в системе подачи элюента. 4. Регулятор перепада давления вышел из строя или неправильно установлен (при работе с подвижными фазами низкой вязкости). Отрегулируйте или замените.
Малые значения перепада давления и расхода	1. Неправильно задано значение объёмного расхода. 2. Частично забился входной фильтр. Выполните очистку или замену. 3. Частично забилась предколонка. Выполните очистку или замену. 4. Частично забилась проходная фритта. Выполните очистку или замену. (Примечание. 1–4 находятся в системе подачи подвижной фазы до датчика давления) 5. Загрязнён обратный клапан. Выполните очистку или замену. 6. Течь в системе. Проверьте все соединения. Затяните или замените.
Большое значение перепада давления, свыше 115 % от нормального, при этом расход нормальный	1. Частично забилась проходная фритта (если она находится после датчика давления). Замените её. 2. Частично забилась защитная колонка. Замените ёе. 3. Частично забился соединительный трубопровод. Замените ёго. 4. Частично забилась петля инжектора. Замените ёе. 5. Введена проба, содержащая большое количество твёрдых микрочастиц. Профильтруйте пробу через совместимую мембрану. 6. Введена проба, растворённая в растворителе, не смешиваемом или несовместимом с подвижной фазой. Измените порядок работы. 7. Частично забились колонка или входная фритта

	колонки. Замените их. (Примечание. 1–7 в порядке следования потока подвижной фазы). 8. Неправильно приготовлена подвижная фаза (теперь её вязкость слишком высока). Приготовьте новую. 9. Частично забился детектор. Выполните очистку. (Примечание. При градиентном элюировании значение вязкости проходит через максимум, соответственно, имеет максимум и перепад давления).
Высокий перепад давления, защита автоматически отключает систему	1. Забилась проходная фритта (если она находится после датчика давления). Замените её. 2. Забилась защитная колонка. Замените её. 3. Забился соединительный трубопровод. Замените его. 4. Забилась петля инжектора. Замените её. 5. Введена проба, содержащая большое количество твёрдых микрочастиц. Профильтруйте пробу через совместимую мембрану. 6. Частично забились колонка или входная фритта колонки. Замените их. (Примечание. 1–6 в порядке прохождения подвижной фазы). 7. Введена проба, растворённая в элюенте, не смешиваемом или несовместимом с подвижной фазой. Измените методику подготовки пробы. 8. Имеет место нормальное старение колонки. Обычно при этом перепад давления постепенно повышается, пока не достигает заданного предельного значения. Чаще всего это случается при градиентном элюировании (когда в ходе опыта перепад давления обычно не контролируют непрерывно). Выполните очистку колонки (обращением потока) или замените её.
Время удерживания всех компонентов изменяется на одну и ту же величину	1. Проверьте значение скорости потока. 2. Проверьте соединения на наличие небольших течей. Подтяните уплотнения. 3. Возможно, используется другая колонка (проверьте соответствие номенклатуры колонки, требуемой по методике, реально используемой: фирма-изготовитель, длина, внутренний диаметр,

		зернение, тип).
Время удерживания изменилось, причём тем сильнее, чем позже выходит пик	1.	Проверьте состав подвижной фазы.
	2.	Сильно изменилась температура. Продумайте возможность использования регуляторов температуры.
	3.	Возможно, используется другая колонка (проверьте соответствие номенклатуры колонки, требуемой по методике, реально используемой: фирма-изготовитель, длина, внутренний диаметр, зернение, тип).
	4.	Колонка используется с другим ион-парным реагентом или модификатором подвижной фазы. Тщательно промойте колонку самым сильным совместимым элюентом или используйте новую колонку.
	5.	Возможно, колонка дезактивирована (например, силикагель – под действием воды). Повторно активируйте и уравновесьте колонку.
Время удерживания меняется случайным образом (при этом может наблюдаться изменение перепада давления)	1.	Полностью уравновесьте систему (в некоторых случаях для этого нужно оставить её на ночь при малом расходе).
	2.	Проверьте, нет ли течей в соединениях и вокруг поршневого уплотнения. Выполните ремонт или замену.
	3.	Выполните очистку обратных клапанов.
	4.	В системе имеется воздушная пробка. а. Устраните промыванием пузырьки воздуха из системы (т.е. входного фильтра, соединительных трубопроводов низкого давления, обратных клапанов). б. Дегазируйте элюент.
	5.	Убедитесь в правильности расположения резервуара с элюентом (выше головки насоса, чтобы была обеспечена подача по принципу сифона).
	6.	В изократическом режиме, если смешение растворителей осуществляется с помощью насоса, а в градиентном режиме – в любом случае проверьте функционирование клапанов, с помощью которых задаётся состав.
Увеличение ширины (одного пика) или ухудшение разрешения	1.	Проверьте правильность выбора внутреннего диаметра соединительных трубок. Ошибка сильнее сказывается формах пиков, выходящих раньше.

(нескольких пиков) – снижение эффективности системы	При необходимости, замените трубки. 2. Проверьте правильность соединений с гайками и обжимными втулками. Выполните затяжку или замену. (В обоих этих случаях нарушение сильнее сказывается на пиках, выходящих раньше). 3. Проверьте рабочие параметры колонки на тест-растворах (описываемое явление нормально для старых колонок). Если колонка к дальнейшей эксплуатации непригодна, замените её.
Удлинение ниспадающей части пика или расщепление пика (снижение эффективности системы)	1. Проверьте правильность соединений с гайками и обжимными втулками, особенно обращая внимание на соединения трубопровода с колонкой. Если необходимо, выполните затяжку или замену. 2. В подвижной фазе закончился модификатор (например, ТФУ или ТЭУ). Приготовьте свежую подвижную фазу. 3. Модификатор подвижной фазы вымыт из подвижной фазы. Приготовьте свежую подвижную фазу. (Примечание. В случаях 3 и 4 приготовьте свежий элюент и выполните повторно уравновешивание системы). 4. При пробоподготовке использован новый или неподходящий растворитель (например, ТГФ). Часто наблюдается, если при пробоподготовке используется более слабый (чем подвижная фаза) растворитель или меняется его состав. Приготовьте свежий растворитель для пробы. 5. Непредвиденные изменения матрицы пробы. 6. Загрязнение фритты (выполните очистку или замену). 7. Загрязнение или старение колонки (выполните очистку или замену).
Размеры одного или нескольких пиков изменяются, однако соответствующее время удерживания остаётся правильным.	1. Проверьте значение коэффициента отклика (R_f) для стандарта. Если R_f изменилось, то: а. Возможно, стандарт испортился; приготовьте свежий (и убедитесь, что для приготовления стандарта используется тот же реактив, а для пробоподготовки – правильный растворитель). б. Выполните очистку инжектора и шприца. в. Убедитесь в правильности объёма вводимой

		пробы. i. Ручной инжектор. Проверьте объём петли-дозатора, а если используется ввод с частичным заполнением петли, – правильность объёма пробы, вводимого в петлю (попробуйте перейти на ввод с полным заполнением петли; затем выполните по меньшей мере 200-кратное переполнение петли). ii. Автоинжектор. Проверьте установки объёма и размера петли-дозатора. Убедитесь в правильности установок по подаче пробы (например, на себя/от себя; вязкое вещество и пр.)
Большой уровень шума нулевой линии	1.	Изократическое элюирование (УФ детектор): длина волны детектора слишком близка к границе пропускания. Шум сильно меняется от партии к партии растворителя. Выберите партию, дающую наименьший уровень шума.
	2.	Изократическое или градиентное элюирование: а. Система не полностью уравновешена, продолжайте прокачивать подвижную фазу. б. Введена загрязнённая проба.
	3.	Градиентное элюирование: один или несколько компонентов подвижной фазы загрязнены. Испытайте каждый компонент по отдельности.
	4.	Загрязнена кювета детектора. Выполните очистку кюветы.
	5.	Воздушная пробка в кювете. Удалите воздух из кюветы промыванием.
	6.	Установка чувствительности изменена на более высокую; шум становится более заметным.
Дрейф нулевой линии	1.	Система не полностью уравновешена, продолжайте прокачивать подвижную фазу.
	2.	Изменяется температура системы. Используйте термостат или другие средства регулирования температуры.
	3.	Состав элюента меняется из-за постоянного барботирования. Выполните барботирование растворителя, затем заполните гелием надповерхностный объём в резервуаре.
	4.	Обусловлен взаимодействием компонентов

		элюирующей смеси; устранению простыми средствами не поддаётся.
	5.	Убедитесь в том, что кюветы детектора (в том числе, эталонная, если используется) не загрязнены и уравновешены.
Смещение нулевой линии	1.	Изменились установки детектора (например, длина волны детектирования). Измените на правильные.
	2.	Детектирование в УФ диапазоне на малой длине волны, при этом элюент не дегазирован. Выполните дегазацию элюента.
	3.	Используется новая партия растворителя или новый состав элюента. Если смещение невелико, продолжайте работу. Если велико, убедитесь в правильности состава элюента или заново приготовьте элюент.
Непредвиденные пики на хроматограмме	1.	Изменения в пробе (устранению не поддаётся; единственная возможность – разработать другую методику пробоподготовки).
	2.	Изократическое или градиентное элюирование:
		а. Загрязнение пробы. Введите пробу чистого растворителя для пробоподготовки, чтобы проверить, не обусловлен ли пик загрязнением растворителя. Если да, замените растворитель и повторите опыт. Если нет, пик обусловлен компонентом матрицы пробы и, скорее всего, не может быть устранён без изменения методики пробоподготовки.
		б. Перенос из предыдущей пробы. Может иметь место попадание остатка предыдущей пробы из инжектора (или шприца), либо элюирование поздно выходящих пиков предыдущей пробы.
	3.	Градиентное элюирование
		а. Загрязнение подвижной фазы. Измените начальный отрезок времени, на котором состав не меняется, чтобы проверить более слабый растворитель. Возможно, необходимо испытать компоненты элюента по отдельности. Заменяйте поочерёдно каждый компонент на новый (из новой партии или свежевскрытого флакона).
		б. Перенос (см. выше).
Невоспроизводимые результаты	1.	Детектор
		а. Проверьте выходную энергию источника. Если

		её значение снижено, замените источник. б. Проверьте наличие течей и пузырьков воздуха. Промойте систему. в. Проверьте установки детектора и системы сбора и обработки данных. г. Убедитесь в том, что не изменился порядок интегрирования (определения зависимости площади пика от высоты). д. Убедитесь в том, что не изменились интервалы интегрирования, а маркеры, показывающие, где начинается и заканчивается интегрирование, выглядят нормально.
	2.	Инжектор а. Если сходимость при повторных вводах стандарта ухудшилась, возможно, инжектор нуждается в очистке. б. Убедитесь в том, что для пробоподготовки использован правильный растворитель. в. Убедитесь в том, что для промывки инжектора использован правильный растворитель.
	3.	Убедитесь в том, что параметры системы сбора данных не изменились (точки пуска обработки пика, частота квантования, параметры группирования и пр.).

АЛФАВИТНО-ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Нештатные ситуации и источники возможных ошибок, а также таблицы выделены полужирным шрифтом.